Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Karlson

Entwicklung und Anwendung einer neuen und empfindlichen Methode zur Analyse zellulärer Glykosphingolipide

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ulrich Schlemmer
aus Steina

Marburg 1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546807_0009

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Karlson

Entwicklung und Anwendung einer neuen und empfindlichen Methode zur Analyse zellulärer Glykosphingolipide

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ulrich Schlemmer
aus Steina

Marburg 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom
Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am 5. 9. 1978
gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Neurath
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. P. Karlson
Correferent: Prof. Dr. rer.nat. H. Wiegandt

Die vorliegende Arbeit entstand am
Institut für Physiologische Chemie I
der Philipps-Universität Marburg
unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. P. Karlson,

dem ich für seine wertvollen
Diskussionen dankbar bin.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. H. Wiegandt

für die Einführung in das Gebiet der
Glykosphingolipide und die Überlassung
des Themas, sowie

Herrn Dr. G. Schwarzmann

für seine stetige und wertvolle Unter-
stützung bei der Durchführung dieser
Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einführung	2
2.	Entwicklung einer Methode zur Analyse von Glykosphingolipiden im Bereich von Nanomol-Mengen	6
2.1.	Einleitung	6
2.2.	Ergebnisse	6
2.2.1.	Extraktion zellulärer Glykosphingolipide	7
2.2.2.	Reinigung der Glykosphingolipide an Florisil	8
2.2.3.	Abtrennung von Salzen und Kohlenhydraten durch Dialyse	11
2.2.4.	Abtrennung des Restcholesterins von den Glykosphingolipiden durch Extraktion in Äther	13
2.2.5.	Radioaktive Markierung der Glykosphingolipide	15
2.2.6.	Autoradiographischer Nachweis von dünnschichtchromatographisch getrennten ^{3}H-Glykosphingolipiden	17
2.2.7.	Versuche zur Charakterisierung der Glykosphingolipide	20
2.2.7.1.	Trennung der Glykosphingolipide in neutrale und saure Komponenten	20
2.2.7.2.	Verfahren der dünnschichtchromatographischen Trennung und Charakterisierung von Glykosphingolipiden	22
2.2.7.3.	Selektiver Neuraminsäureabbau	23
2.2.7.4.	Partielle Säurehydrolyse der Kohlenhydratteile von Glykosphingolipiden	26
2.2.7.5.	Verteilung der ungesättigten Fettsäuren und des Sphingosins im Ceramidteil von Glykosphingolipiden	29
2.2.7.6.	Semiquantitative Bestimmung mittels eines internen Standards	29
2.2.8.	Prüfung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Trennungsganges	30
2.3.	Diskussion der Glykosphingolipid-Analysenmethode	32
3.	Anwendungsbeispiele der Analysenmethode	38
3.1.	Einleitung	38
3.2.	Ergebnisse	40
3.2.1.	Untersuchung der Resorption und der Glykosphingolipide des Rattendarms	40
3.2.1.1.	Änderung der Resorption von D-Glucose und L-Leucin in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Nährstoffversorgung des Rattendarms	40

Sei

3.2.1.2. Analyse der Glykosphingolipide in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Nährstoffversorgung des Rattendarms 51

3.2.1.2.1. Auftrennung und dünnschichtchromatographische Darstellung der Glykosphingolipid-Muster 51

3.2.1.2.2. Spezielle Untersuchungen der wichtigsten Glykosphingolipid-Veränderungen und Phospholipidveränderungen 56

3.2.2. Änderung der Glykosphingolipid-Zusammensetzung des Kaninchendarms nach Enterotoxin-Inkubation 81

3.2.3. Änderung der Hirn-Glykosphingolipide von Göttinger Minischweinen nach pharmakologischer Behandlung mit Chlorochin 83

3.2.4. Untersuchung der Glykosphingolipid-Zusammensetzung peripherer Humanlymphozytenpopulationen 85

3.3. Diskussion 87

4. Material und Methoden 93

4.1. Entwicklung der Analysenmethode 94

4.1.1. Untersuchung der einzelnen Schritte der Analysenmethode 94

4.1.2. Prüfung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Analysenmethode im Mikromolbereich und Durchführung der Analysenmethode im Nanomolmaßstab 100

4.2. Anwendungsbeispiele der Analysenmethode 107

4.2.1. Änderung der Glykosphingolipide des Rattendarms nach Änderung der Nährstoffversorgung der Ratten 107

4.2.2. In vitro-Transport von D-Glucose und L-Leucin von der Mukosa- zur Serosaseite gegen einen Konzentrationsgradienten 109

4.2.3. Gaschromatographische Zuckeranalyse 111

4.2.4. Gaschromatographische Analyse von Fettsäuren und Sphingosin 111

4.3. Änderung der Glykosphingolipide nach Inkubation des Kaninchendarms mit Enterotoxinen 112

4.4. Änderung der Hirnglykosphingolipide des Göttinger Minischweines nach Chlorochinbehandlung 113

4.5. Untersuchung der Glykosphingolipid-Zusammensetzung peripherer Humanlymphozytenpopulationen 113

4.6. Zusammenfassung 114

4.7. Literaturverzeichnis 116

Abkürzungen:

DEAE-Sephadex	=	Diäthylaminoäthyl-Sephadex
Ose_1C^{x}	=	Monohexosylceramid
Ose_2C^{x}	=	Dihexosylceramid
Ose_3C^{x}	=	Trihexosylceramid
Ose_4C^{x}	=	Tetrahexosylceramid
$SULF^{x}$	=	Sulfatid
$G_{Lac}{}^{1}{}^{(I)(x)}$	=	II^3NeuAc-Lac-Cer (II) (G_{M3}) (III)
$G_{Gtri}{}^{1}{}^{(I)(x)}$	=	II^3NeuAc-GgOse$_3$-Cer (II) (G_{M2}) (III)
$G_{Gtet}{}^{1}{}^{(I)(x)}$	=	II^3NeuAc-GgOse$_4$-Cer (II) (G_{M1}) (III)
Stand.	=	Standard-Glykosphingolipide

(I) entsprechend der Nomenklatur von H. Wiegandt (1)

(II) entsprechend der Nomenklatur von L. Svennerholm (2)

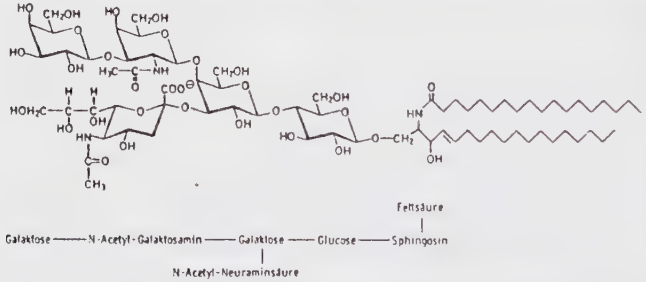
(III) Abkürzung - entsprechend den Empfehlungen der IUPAC-IUB nomenclature commission, lipid document 1976

(x) Die in dieser Arbeit verwendeten neutralen Glykosphingolipid-Standards für die Dünnschichtchromatographie wurden aus Menschenmilz isoliert und sind der Globo-Serie zuzuordnen.
Da über die Struktur der Glykosphingolipide des Rattendarms nichts bekannt ist, wurde eine gemeinsame Abkürzung für die Standard- und Proben-Glykosphingolipide verwendet, die die Zugehörigkeit der Glykosphingolipide zu bestimmten Serien nicht berücksichtigt.

1. Einführung

Glykosphingolipide sind wesentliche Bestandteile der Plasmamembran tierischer Zellen. Sie erlangten erstmals größeres wissenschaftliches Interesse, als festgestellt wurde, daß bestimmte Glykosphingolipide bei verschiedenen Sphingolipidosen in hohem Maße im Gehirn und auch in anderen Organen gespeichert wurden (3,4,5).

Die Glykosphingolipide bestehen in ihrem molekularen Aufbau aus einem unpolaren Ceramidteil, gebildet aus einer Sphingoidbase, die mit einer Fettsäure durch eine Amidbindung verknüpft ist, sowie aus einem polaren Kohlenhydratteil (6). Der Kohlenhydratteil ist glykosidisch mit der primären Hydroxylgruppe der Sphingoidbase verbunden.



Als Fettsäuren der Glykosphingolipide sind neben gesättigten auch ungesättigte und ß -Hydroxy-Fettsäuren bekannt. Die Sphingoidbase wird im wesentlichen durch Sphingosin, Sphinganin oder 4D-Hydroxysphinganin gebildet. Im Kohlenhydratteil können als neutrale Zucker D-Glucose, D-Galaktose, D-Mannose, D-Fucose und Arabinose neben den Hexosaminen N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalaktosamin vorhanden sein.

In Gangliosiden kommen noch zusätzlich eine oder mehrere Neuraminsäuren als N-Acetyl- oder N-Glykolyl-Derivate vor. Sulfatide besitzen neutrale Zucker, die eine Sulfatestergruppe im Kohlenhydratteil tragen.

Durch das Vorkommen und die Sequenz der verschiedenen Zucker, wie auch durch unterschiedliche anomere Verknüpfungen bedingt, ist eine große Anzahl unterschiedlicher

Kohlenhydrat-Reste in Glykosphingolipiden aufgefunden worden. Die jeweils typischen und zum Teil spezifischen Eigenschaften der Glykosphingolipide werden durch ihren Kohlenhydratteil bestimmt, wonach sie auch unterschieden und klassifiziert werden.
Dabei lassen sich die Kohlenhydratteile auf Grund der Sequenz der Monosaccharidbausteine in drei Hauptreihen zusammenfassen: Die Ganglio-Serie (Gal-GalNAc-Gal-Glc), die Lacto-Serie (Gal-GlcNAc-Gal-Glc) und die Globo-Serie (GalNAc-Gal-Gal-Glc). Bisher sind Neuraminsäuren nur in solchen Glykosphingolipiden aufgefunden worden, deren Kohlenhydratteile der Ganglio- oder Lacto-Serie zuzuordnen sind (6).

Es gilt als äußerst wahrscheinlich, daß die Glykosphingolipide in der Membran derart orientiert sind, daß der unpolare Ceramidteil in der Lipiddoppelschicht lokalisiert ist, während der Kohlenhydratteil in den extrazellulären Raum hinausragt und damit zur Glykokalix, der kohlenhydrathaltigen Zelloberflächenschicht, beiträgt.

Es wird vermutet, daß die Glykokalix mit ihren vielfältigen Zuckerstrukturen, sowie mit ihren funktionellen Gruppen, wie den Carboxyl-, Sulfat- oder auch Phosphatgruppen an Interaktionen der Zellen mit Substraten des Extrazellularraumes beteiligt ist. Dabei erscheinen die Glykosphingolipide zur Aufnahme und Weiterleitung von extrazellulären Informationen für die Zelle besonders geeignet zu sein, da die für die spezifische Informationsaufnahme wahrscheinlich erforderlichen Kohlenhydratstrukturen der Glykosphingolipide direkt mit der Hauptpermeationsbarriere, der Lipiddoppelschicht, in Verbindung stehen.

Eine Vielzahl von Hinweisen deutet an, daß eine verminderte Glykosphingolipid-Ausprägung, wie sie bei malignen Transformationen von Zellen zu finden ist, zu einer Beeinträchtigung der Informationsübermittlung führt. Hier konnten Hakomori(7,8),Brady (9) und auch andere Autoren zeigen, daß bei virustransformierten Zellen im Gegensatz

zu nicht transformierten Zellen einfachere Kohlenhydratketten in den Glykosphingolipiden auftreten und weniger Neuraminsäuren aufweisen. Gleichzeitig ist ein Verlust der Wachstumsinhibition dieser Zellen bei Zell-Zell-Kontakt zu beobachten.
Diese Befunde haben u.a. Roseman (10) und Roth und White (11) zur Arbeitshypothese veranlaßt, daß bei Zell-Zell-Kontakt einzelne Zucker von Glykokonjugaten mit Hilfe von Transferasen von einer auf eine andere Zelle übertragen werden. Bei der Krebszelle kommt es dabei, nicht wie bei der normalen Zelle zu einer Trans-Glykosylierung, sondern vielmehr zu einer Cis-Glykosylierung.

Ein Beispiel für die Bedeutung der Glykosphingolipide als Mediatoren von Informationen ist die Rolle, die sie als Rezeptoren von Bakterien-Toxinen spielen. Van Heyningen wies nach, daß Ganglioside Rezeptoren für Tetanus- und Choleratoxin darstellen (12). Für andere Wirkproteine wie für Staphylokokkentoxin, Interferon, Abrin, Rizin u.a. werden ebenfalls Glykosphingolipide als Rezeptoren diskutiert.

Inwieweit die offensichtlich spezifischen Wechselwirkungsmöglichkeiten, die die Glykosphingolipide als Träger von Blutgruppeneigenschaften besitzen, für die Informationsaufnahme interessant sind, ist bisher noch völlig unbekannt (13,14,15).

Nach ihrer quantitativen und qualitativen Zusammensetzung scheinen die Glykosphingolipide wie im Fall der transformierten Zellen einer genetischen Regulation zu unterliegen. Darüberhinaus werden in unterschiedlichen Tierspezies verschiedene Kohlenhydrat-Serien in den Glykosphingolipiden aufgefunden(6).

Allerdings ist ebenfalls bekannt, daß diese Kohlenhydrat-Serien der Glykosphingolipide in quantitativer und sogar auch in qualitativer Hinsicht im Zellwachstum, im Zellzyklus, bei Zelldifferenzierung oder durch Eingriffe in den Zellstoffwechsel verändert werden können (7,16).

Ob diese Beeinflussungen der Glykosphingolipid-Muster an der Zelloberfläche von funktionaler Bedeutung für die Eigenschaften der Membran sind, muß bis heute noch in Frage gestellt werden.

Bei dem angeführten Beispiel der Wechselwirkungen zwischen membranständigem Gangliosid und Choleratoxin wird möglicherweise ein physiologischer Mechanismus ausgenutzt, um in "pathologischer Weise" das Toxin in die Zelle einschleusen zu können.

Obwohl es bis heute den Arbeitskreisen um Hakomori, Klenk, Svennerholm, Wiegandt u.a. gelungen ist, die Strukturen von mehr als 50 verschiedenen Glykosphingolipiden aufzuklären (17), kann doch relativ wenig über deren exakte Bedeutung in der Zellmembran ausgesagt werden.

Um weitere Hinweise zur Aufklärung der biologischen Bedeutung der Glykosphingolipide in der Membran erhalten zu können, wäre es sehr nützlich, funktionelle Änderungen der Membran direkt mit Veränderungen ihrer Glykosphingolipide korrelieren zu können. In der vorliegenden Arbeit sollen unter diesem Aspekt Zellen oder Gewebe, deren Funktionen durch experimentelle Eingriffe verändert wurden, auf ihre Glykosphingolipide untersucht werden.

2. Entwicklung einer Methode zur Analyse von Glykosphingolipiden im Bereich von Nanomol-Mengen

2.1. Einleitung

Vergleichende Untersuchungen zur Korrelierung funktioneller Veränderungen der Membran mit Änderungen ihrer Glykosphingolipid-Muster lassen sich, um eindeutige Ergebnisse zu erhalten, am besten mit möglichst homogenem Zellmaterial durchführen.
Je homogener allerdings das Zellmaterial ist, um so weniger Zellen stehen im allgemeinen zur Verfügung. Aus diesem Grunde ist es nötig, derartige vergleichende Glykosphingolipid-Untersuchungen mit einer sehr empfindlichen Analysenmethode durchzuführen.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Methoden befassen sich einerseits mit Problemen der Extraktion von zellulären Glykosphingolipiden, ihrer Anreicherung und säulen- oder dünnschichtchromatographischen Auftrennung (18-26). Andererseits sind Methoden zur Markierung und zum Nachweis von Glykosphingolipiden publiziert worden (27-33). Mit diesen einzelnen Methoden ist allerdings eine genügend empfindliche qualitative und quantitative Bestimmung oder Charakterisierung von Glykosphingolipiden geringster Mengen Probenmaterials nicht möglich.
Deshalb mußte eine Methode entwickelt werden, die eine Charakterisierung und möglichst quantitative Bestimmung der Glykosphingolipide im Bereich von Nanomol-Mengen gewährleistet.

2.2. Ergebnisse

Eine Methode, die die unter Punkt 2.1. geforderten Bedingungen erfüllte, konnte entwickelt werden. Sie beruht auf folgenden Grundsätzen:

1) Totalextraktion der Glykosphingolipide mit Chloroform-Methanol-Gemischen.

2) Reinigung der Glykosphingolipide nach Peracetylierung an Florisil nach Saito und Hakomori (21).

3) Tritium-Markierung der de-O-acetylierten Glykosphingolipide nach Schwarzmann (33).

4) Dünnschichtchromatographische Trennung der Glykosphingolipide und ihre Charakterisierung durch Trennung der Gesamt-Glykosphingolipide in neutrale und saure Komponenten an DEAE-Sephadex (22); durch selektiven Neuraminsäure-Abbau mit Neuraminidase (vibrio cholerae) bei Gangliosiden; durch partielle Säurehydrolyse der Kohlenhydratanteile; Bestimmung der ungesättigten Fettsäuren und der ungesättigten Sphingoidbasen im Ceramidteil.

5) Semiquantitative Bestimmung der Glykosphingolipide durch Vergleich der Tritium-Markierungen des Sphingosins der Proben-Glykosphingolipide und eines internen Glykosphingolipid-Standards.

Die einzelnen Schritte dieser empfindlichen Analysenmethode wurden mit Glykosphingolipiden im Mikromol-Maßstab unter Zusatz von tritium-markierten Glykolipiden untersucht.

Dadurch konnten die Ergebnisse, die mit ^{3}H-Glykolipiden erzielt wurden, durch spezifische farbchemische Nachweisverfahren nach dünnschichtchromatographischer Identifizierung verifiziert werden.

2.2.1. Extraktion zellulärer Glykosphingolipide

Zur Überprüfung der vollständigen Extraktion von Glykosphingolipiden mit Chloroform-Methanol-Gemischen wurde nativer und gefriergetrockneter Rattenmilz ^{3}H-$G_{Lac}1$ und ^{3}H-Galaktosylceramid vor der Extraktion injiziert.
Dabei konnte die Extraktion mit gefriergetrocknetem und anschließend zermörsertem Material mühelos sauber und mit kleinen Lösungsmittelvolumina durchgeführt werden.
Das Zerkleinern des nativen Materials in Chloroform-Methanol und das quantitaive Überführen des Homogenat-Breies in das

Extraktionsgefäß bereitete dagegen Schwierigkeiten und erforderte ein sehr großes Lösungsmittelvolumen.

Deshalb wurde im folgenden nur noch mit gefriergetrocknetem Material gearbeitet.

Zur Extraktion von Glykosphingolipiden aus gefriergetrocknetem Gewebe mußte ein Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch (10:10:1, v/v) verwendet werden, um 98 % der Glykosphingolipide isolieren zu können.

Wurde hingegen mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch extrahiert, konnten nur 90 % der Glykosphingolipide aus dem gefriergetrockneten Gewebe herausgelöst werden.

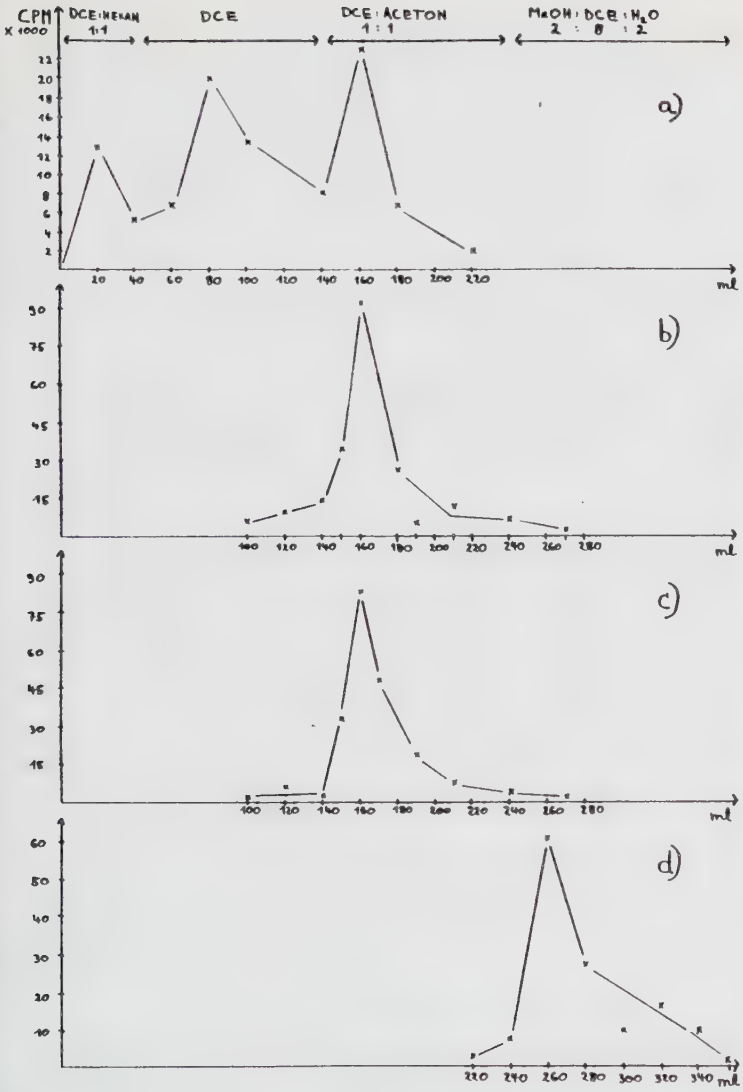
2.2.2. Reinigung der Glykosphingolipide an Florisil

Die Reinigung der Glykosphingolipide von Cholesterin, Cholesterinestern, Proteinen und Phospholipiden wurde nach der Methode von Saito und Hakomori (21) durchgeführt.

Sie besteht im Prinzip auf der Trennung peracetylierter Glykosphingolipide von Cholesterinestern, Phospholipiden und Proteinen an Florisil. Die isolierten peracetylierten Glykosphingolipide werden anschließend de-O-acetyliert.

Da sich herausstellte, daß unter den von den Autoren beschriebenen Bedingungen eine quantitative Abtrennung des Cholesterins und der Cholesterinester nicht erzielt und außerdem eine quantitative Eluierung der peracetylierten Glykosphingolipide vom Florisil nicht erreicht werden konnte, wurde eine genaue Untersuchung dieser Methode notwendig.

In systematischen Untersuchungen (4.1.1.) wurde gefunden, daß sich weniger als die Hälfte der Cholesterinester von den peracetylierten Glykosphingolipiden abtrennen lassen und zur Eluierung von mehr als 95 % der peracetylierten Glykosphingolipide das 15-Fache des von den Autoren angegebenen Elutionsvolumens von 1,2-Dichloräthan (DCE) : Aceton (1:1, v/v) benötigt w rd (Figur 1, Tabelle I).



Figur: 1

Elutionsdiagramm der Florisilsäule

a) Elution der Cholesterinester
b) Elution der peracetylierten neutralen Glykosphingolipide
c) Elution der peracetylierten Ganglioside
d) Elution der Phospholipide

Tabelle: I Elution der Florisilsäule (s. Figur 1)

Elutions-volumina in ml	Cholesterin-fraktion in %	Neutrale-GSL-Fraktion in %	Gangliosid-Fraktion in %	Phospho-lipid-fraktio in %
20	12,4			
40	5			
60	6,5			
80	19,5			
100	13	2,5	1	
120	-	3,2	2	
140	7,8	5	1	
150	-	18,5	14,9	
160	22,2	45,8	39	
170	-	14	25,2	
180	5,7	-	-	
190	-	3,5	7,8	
200	-	-	-	
220	1,8	3	3,2	1,8
240		-	-	4,5
260		-	-	40,2
270		1	1	-
280				18,1
300				6,7
320				11
340				7
Summe:	93,9 %	96,5 %	95,1 %	89,3

In weiteren Untersuchungen konnte durch eine Modifizierung dieses Verfahrens eine Optimierung (4.1.1.) erzielt werden, die eine vollständige Abtrennung von 60 % der Cholesterinester, sowie aller Proteine, Phospholipide und Kohlenhydrate gewährleistet.

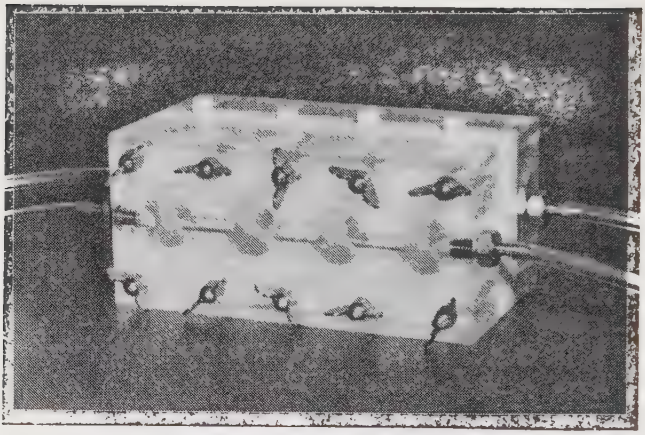
2.2.3. Abtrennung von Salzen und Kohlenhydraten durch Dialyse

Das bei der De-O-Acetylierung entstandene Natriumacetat und die Kohlenhydrate, die durch die Florisilchromatographie nicht abgetrennt werden konnten, mußten durch Dialyse entfernt werden.

Im Gegensatz zur Auffassung von Saito und Hakomori (21) war eine Abtrennung von Natriumacetat etwa durch Dialyse unerläßlich, da eine anschließende dünnschichtchromatographische Trennung speziell der Ganglioside in Gegenwart von Natriumacetat völlig unzureichend verlief.

Wurden dabei zusätzlich den Laufmitteln noch $CaCl_2$ (26) oder NH_3 zugesetzt, um eine schärfere dünnschichtchromatographische Trennung der Glykosphingolipide zu erreichen, so war die Trennleistung der Kieselgelplatten ungenügend (Bild 7).
Eine Trennung auch von Isomeren einzelner Glykosphingolipide ist jedoch für die Charakterisierung von Glykosphingolipiden mit einer solchen Analysenmethode eine unerläßliche Voraussetzung.

Da nach Kenffer (34) die Möglichkeit bestand, daß Glykosphingolipide in submicellaren Konzentrationen durch Dialysemembranen hindurchdiffundieren können, mußte eine Dialyseprozedur entwickelt werden, bei der möglichst geringe Verluste auftreten.
Um dies erreichen zu können und zur Vermeidung unnötiger Verluste bei der Handhabung der Dialyse kleinster Mengen von Glykosphingolipiden wurden verschiedene Typen von Dialysekammern entwickelt. Die für diese Methode opti-



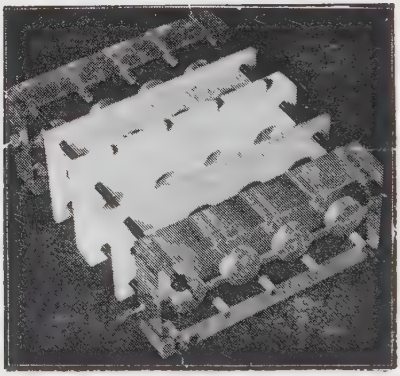


Bild: 1 Doppelmembran-Dialysekammer

Das obere Bild zeigt die zusammengesetzte, funktionsfertige Dialysekammer.
Das untere Bild zeigt die einzelnen Bestandteile der Dialysekammer. Die beiden äußeren Scheiben, bestehend aus durchsichtigem Plexiglas, werden kontinuierlich mit bidestilliertem Wasser durchströmt.
Die mittlere Scheibe, bestehend aus Teflon, wird von beiden Seiten mit einer Membran eingeschlossen, die im Bild nicht sichtbar ist.
Die vier zylinderförmigen Bohrungen in der mittleren Teflonscheibe werden durch Kanäle von oben her gefüllt und entleert, die durch Spezialstopfen verschließbar sind.

mierte Dialysekammer war eine Doppelmembran-Dialysekammer, die aus einem beidseitig durch Dialysemembranen verschlossenem Teflonzylinder bestand (Bild 1).

Mit dieser Kammer konnte die Dialysezeit auf 6 Stunden limitiert werden. Dabei betrugen die Verluste, bezogen auf eine ^{3}H-$G_{Gtet}1$-Probe nur 1,8 %.

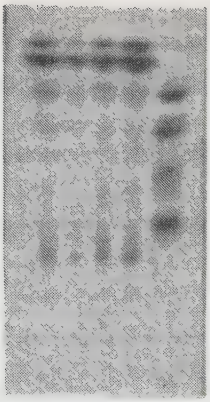
2.2.4. Abtrennung des Restcholesterins von den Glykosphingolipiden durch Extraktion in Äther

Das nach der Reinigung an Florisil in der Probe verbliebene Restcholesterin (Bild 2) mußte abgetrennt werden, da das Cholesterin, durch Schleppeffekte bedingt, die Feinauftrennung von Glykosphingolipiden verhindert. Darüberhinaus war eine solche zusätzliche Reinigung notwendig, da die Semiquantifizierung der Glykosphingolipide über ein modifiziertes Glykosphingolipid als internen Standard (4.1.1.) erfolgen sollte, der den Proben-Glykosphingolipiden vor der Tritium-Markierung zugesetzt und nach anschließender co-chromatographischer Trennung im Dünnschichtchromatogramm im Bereich des Cholesterins läuft.

Eine Abtrennung dieses Cholesterins ließ sich optimal durch Extraktion mit absolutem Äther bei Temperaturen zwischen -30 und -78 °C durchführen (Bild 3) (4.1.1.).

Der Erfolg dieser Abtrennung von Cholesterin hing vor allem von der Konzentration des Cholesterins in der Probe ab. Beim Darm ist der Cholesteringehalt sehr hoch. Deshalb muß sehr sorgfältig das Cholesterin aus der Probe entfernt werden. Dabei ist ein Verlust von ca. 10 % des Monohexosylceramids, das im Äther gelöst wird und der mittels ^{3}H-Galaktosylceramid ermittelt wurde, unvermeidlich. Bei Lymphozyten war der Verlust von Monohexosylceramids, das im Äther in Lösung ging, kleiner als 2 %.

Wurden die Glykosphingolipide aus einem Gewebe extrahiert, das einen besonders hoher Anteil von Cholesterin enthielt, so konnte der Verlust an Monohexosylceramid bei der Äther-



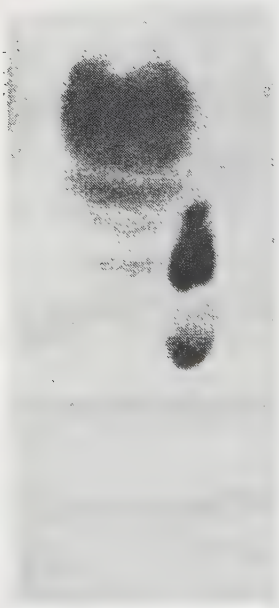
Cholesterin
Ose_4C
Ose_2C
Ose_3C
Ose_4C
G_{Lac}^1
Start

Proben: 1 2 3 4 Standard

Bild: 2

Glykosphingolipide aus Rattendarm nach der Reinigung an Florisil

Kieselgelplatten, Kieselgel 60, 5 x 10 cm (E. Merck),
Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (60:35:8, v/v)
angefärbt mit -Naphtol-Schwefelsäure



Cholesterin
Ose_1C
Ose_2C und SULF
Start

Bild: 3

Abtrennung von Cholesterin aus einer Probe von Rattenhirn-Glykosphingolipiden

Trennbedingungen wie Bild: 2

In Äther gelöstes Cholesterin

Rückstand nach der Ätherextraktion

extraktion durch eine Re-Ätherextraktion des eingedampften Ätherextraktes wesentlich verringert werden.

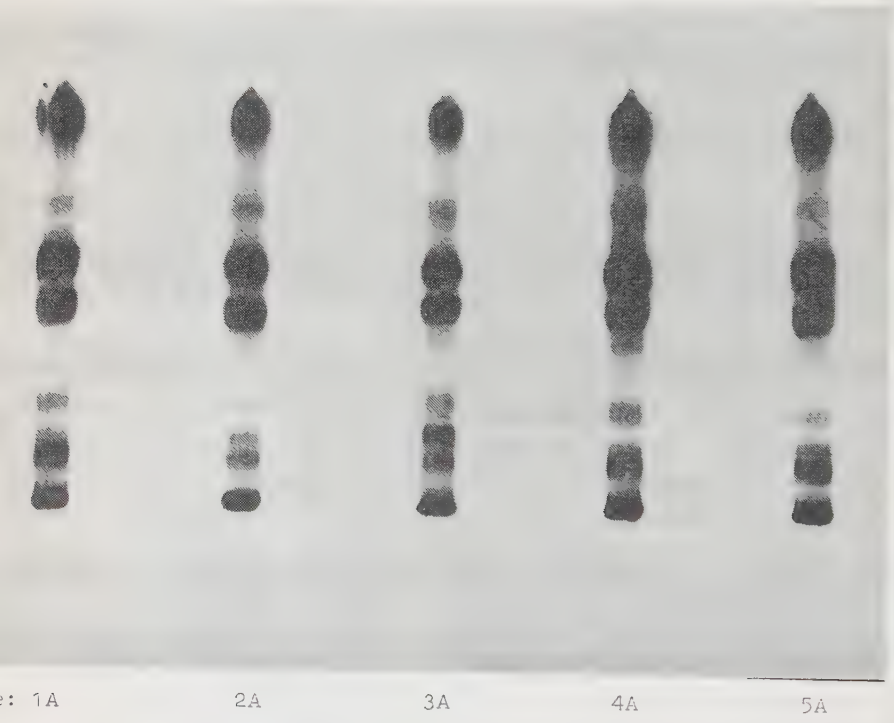
2.2.5. Radioaktive Markierung der Glykosphingolipide

Um die Glykosphingolipide im Nanomol-Bereich nachweisen und charakterisieren zu können, wurden sie nach G. Schwarzmann (33) radioaktiv markiert. Dabei wurden die Glykosphingolipide in einem Lösungsmittelgemisch aus Tetrahydrofuran, Diäthylglycoldimethyläther und Natronlauge mit ^{3}H-Kaliumborhydrid und Palladiumchlorid als Katalysator tritiiert (4.1.1.).

Zur semiquantitativen Bestimmung wurde den Glykosphingolipiden 3,4-Isopropyliden-ß-D-galaktosylceramid als interner Standard bei der Markierung zugesetzt. Dieser Standard wanderte bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung schneller als jedes natürlich vorkommende Glykosphingolipid, das bisher aufgefunden wurde (Bild 4).
Sollten nur Ganglioside oder Sulfatide radioaktiv markiert werden, so wurde Galaktosylceramid aus Menschenhirn als interner Standard verwendet.

Mit dieser Markierungsmethode (4.1.1.) konnten die Glykosphingolipide mit einer Spezifität von $1{,}2 \times 10^{5}$ cpm/n Mol markiert werden. Bei der Hydrierung blieben die Glykosphingolipide stabil und wanderten im Falle der neutralen Glykosphingolipide während der dünnschichtchromatographischen Auftrennung geringfügig weiter als die unmarkierten Glykolipide (33). Der Grund dafür lag in der Aufhebung der Doppelbindung, wodurch wahrscheinlich weniger Wechselwirkungen mit dem Kieselgel stattfinden konnten. Bei einem weiteren Versuch konnten im Falle einer Probe von G_{Lac}^{1} eine Spezifität von 6×10^{5} cpm/n Mol erzielt werden. Mit ^{3}H-Kaliumborhydrid, das eine noch höhere spezifische Aktivität besaß, konnte die spezifische Aktivität bei Glykosphingolipiden auf 10^{6} cpm/n Mol gesteigert werden (4.1.1.).

Film:



Wanderungsverhalten des 3,4-Isopropyliden-ß-D-galaktopyranosyl-ceramid Standards bei der dünnschichtchromatographischen Trennung.

L = Laufmittelfront
IPS = 3,4-Isopropyliden-ß-D-galaktopyranosylceramid
Ose_1C = Monohexosylceramid

Kieselgelfertigplatte (E. Merck)
Kieselgel 60,
Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (10:1,5:0,1, v/v)
Film: Kodak RP-X-Omat, Belichtungszeit: 72 h, -78 °C
Autoradiogramm

Die nächste Aufgabe bestand darin, die radioaktiv markierten Glykolipide auf dem Dünnschichtchromatogramm zu lokalisieren.

2.2.6. Autoradiographischer Nachweis von dünnschichtchromatographisch getrennten ^{3}H-Glykosphingolipiden

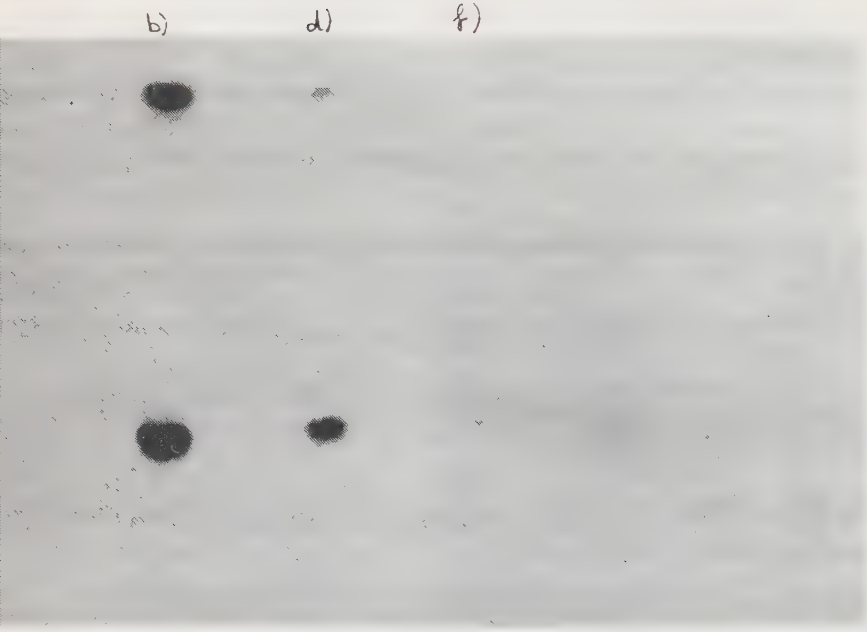
Mit einer Modifizierung der von Randerath (35) publizierten Methode zur Lokalisierung radioaktiv markierter Substanzen nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung konnte durch zweifach gegenläufiges Eintauchen des Dünnschichtchromatogramms in eine 14 %ige 2,5-Diphenyloxazol (PPO)-Äther-Lösung ein gleichmäßiges Aufbringen von 270 mg PPO/90 cm^2 erreicht werden.

Dadurch konnte eine optimale Beschichtung von PPO als Szintillator auf dem Dünnschichtchromatogramm erzielt werden, wodurch noch eine Aktivität von 100 pCi (200 dpm) pro 0,5 cm^2 auf Hochleistungschromatographie-Platten von E. Merck nachzuweisen war (siehe Bild 5).

Wurden höher konzentrierte PPO-Äther-Lösungen verwendet, fiel das PPO ungleichmäßig auf der Platte aus, was eine unspezifische Fleckenbildung auf dem Autoradiogramm zur Folge hatte.

Zur Lokalisierung radioaktiver Glykosphingolipide auf dem Dünnschichtchromatogramm wurden nach dem Lauf die Platten mit radioaktiver Tinte indiziert. Mit Hilfe dieser Indizierung konnte die Filmplatte nach ihrer Entwicklung in die "ursprüngliche Position" auf das Dünnschichtchromatogramm gelegt werden und die Lage der Glykosphingolipid-Banden konnte auf der Kieselgelplatte genau lokalisiert werden (Bild 6 und Bild 8c). Sollten die Glykosphingolipide ausgekratzt und weiteruntersucht werden, so wurden nur einige Millimeter der beiden Bandenenden mit PPO beschichtet (Bild 6). Auf dem Autoradiogramm erschienen dadurch nur die beiden Enden der Banden, wodurch dann der

Anlage 1

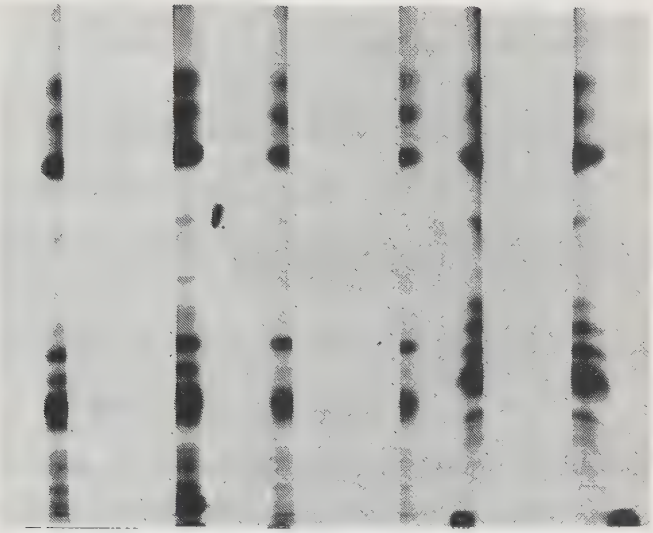


Ermittlung der unteren Nachweisgrenze von ^{3}H-Glykolipiden mittels der Autoradiographie

a:	125 000 dpm
b:	25 000 dpm
c:	5 000 dpm
d:	1 000 dpm
e:	200 dpm
f:	50 dpm
g:	10 dpm

HPTLC-Platte (E. Merck) mit PPO beschichtet,
Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (60:35:8, v/v),
Film: Kodak X-Omat, 7 Tage Belichtung bei -78 °C

Bild: 6



a b a

Dünnschichtchromatographische Auftrennung neutraler Glykosphingolipide des Rattendarms

a = Mit PPO beschichteter Teil des Dünnschichtchromatogramms

b = Ohne PPO beschichteter Teil des Dünnschichtchromatogramms

Kieselgelfertigplatte 10 x 20 cm (E. Merck, Kieselgel 60

Laufmittel: $CHCl_3$: CH_3OH : H_2O (65:25:4, v/v),

Film: Kodak X-Omat, 48 h belichtet , -78 °C

Verlauf der gesamten Bande bestimmt werden konnte. Der mittlere Teil der Bande - ohne PPO - konnte daraufhin ausgekratzt werden, um die Untersuchungen zur Charakterisierung der Glykosphingolipide durchführen zu können.

Wurde die Fluorographie bei +20 °C anstatt bei -78 °C durchgeführt, so sank die Nachweisgrenze für die Erfassung der radioaktiven Substanzen um den Faktor 20 ab. Die Schwärzungszunahme des Filmes als Nachweis für ^{3}H-Glykosphingolipide nahm mit der Länge der Belichtungsdauer zu und erreichte nach sieben Tagen ein Optimum. Darüberhinaus trat keine Schwärzungssteigerung des Films mehr ein und feinste Unterschiede von dünnschichtchromatographisch getrennten ^{3}H-Glykosphingolipiden verschwanden infolge seitlicher Ausdehnung und anschließender Überlappung der Banden.

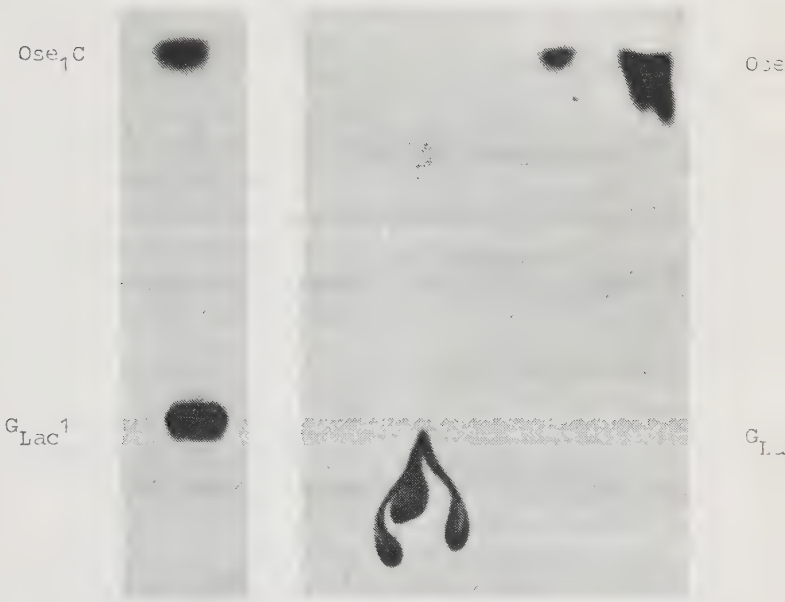
2.2.7. Versuche zur Charakterisierung der Glykosphingolipide

2.2.7.1. Trennung der Glykosphingolipide in neutrale und saure Komponenten

Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung, der von allen Begleitsubstanzen gereinigten tritiummarkierten Glykosphingolipide, überlagerten sich zum Teil die neutralen und sauren Glykosphingolipide.
Deshalb mußten zur genaueren Charakterisierung eine Trennung dieser beiden Glykosphingolipidgruppen in neutrale und saure Komponenten mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie nach Ledeen et.al. (22) durchgeführt werden.

Auch hier war es nötig, die Methode mit ^{3}H-Galaktosylceramid als neutralem Glykosphingolipid und ^{3}H-$G_{Lac}1$ als Vertreter der Ganglioside auf ihre Genauigkeit zu testen und sie anschließend zu modifizieren (4.1.1.).
Mit der entwickelten Prozedur verlief die Trennung des Monohexosylceramids vom $G_{Lac}1$ praktisch vollständig, wie das Autoradiogramm Bild 7 zeigt.

Bild: 7



Trennung neutraler von sauren Glykosphingolipiden über DEAE-Sephadex

a) Mischung von Ose_1C- und $G_{Lac}1$-Standard vor der Trenn über DEAE-Sephadex ohne Natriumacetat
b) $G_{Lac}1$- nach der Trennung (Fraktion B) in Gegenwart v Natriumacetat
c) Ose_1C nach der Trennung (Fraktion A) in Gegenwart vo Natriumacetat

Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (60:35:8, v/ + 20 mg $CaCl_2$ pro 100 ml Solvent
Film: Kodak X-Omat, 48 h, -78 °C

Dabei gelangten weniger als 1 % des Monohexosylceramids in die Fraktion der sauren Glykosphingolipide und umgekehrt nur 0,5 % des G_{Lac}^1 in die Fraktion der neutralen Glykosphingolipide.
Von dem ^{3}H-Monohexosylceramid konnten 2 - 3 % und vom ^{3}H-G_{Lac}^1 4 - 5 % nicht mehr von der Säule eluiert werden.
Wie aus Bild 7 hervorgeht, ist eine Dialyse der getrennten neutralen und sauren Glykosphingolipide notwendig, da eine einwandfreie dünnschichtchromatographische Auftrennung besonders der Ganglioside und Sulfatide in Gegenwart des aus dem Elutionsmittel stammenden Natriumacetats nicht möglich ist.

2.2.7.2. Verfahren der dünnschichtchromatographischen Trennung und Charakterisierung von Glykosphingolipiden

Es wurden verschiedene Laufmittel zur dünnschichtchromatographischen Trennung und Charakterisierung von Glykosphingolipiden auf unterschiedlichen Kieselgelplatten bei veränderten Trennbedingungen getestet.
Dabei konnten gute Trennergebnisse auf Kieselgelfertigplatten (Kieselgel 60, Merck) oder auf High Performance thin Layer Chromatographic Plates (HPTLC-Platten) mit den Laufmitteln Nr. I - VII (4.1.1.) erzielt werden, denen z. T. nach van den Eijnden (26) CaC_2 oder KCl zugesetzt wurden.

Die neutralen Glykosphingolipide wurden am besten mit Laufmittel Nr. I, ganz unpolare Glykosphingolipide wie 3,4-Isopropylidin-ß-D-galaktosylceramid am besten mit Laufmittel Nr. II und die sauren Glykosphingolipide am besten mit Laufmittel Nr. III auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60) in laufmittelgesättigter Atmosphäre getrennt.

Wurden HPTLC-Platten verwendet, so konnten wesentlich verbesserte Trennungen erzielt werden, wenn die chromatographische Entwicklung der HPTLC-Platte in kleinen Laufmittel-

gefäßen (100 - 300 ml) und in einer nicht mit Laufmittel gesättigten Atmosphäre durchgeführt wurde.
Da die HPTLC-Platten völlig andere Trenneigenschaften als die normalerweise verwendeten Kieselgel 60-Platten aufwiesen, mußten zur Trennung von Glykosphingolipiden neue Laufmittel entwickelt werden. Für die Trennung von Monosialogangliosiden wie $G_{Lac}1$ und $G_{Gtet}1$ erwies sich Laufmittel IV als geeignetes Laufmittel. Dabei konnte eine so gute Trennung einzelner $G_{Lac}1$-Isomere erreicht werden, wie sie bisher noch nicht publiziert wurde (Bild 8c). Zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung von neutralen Glykosphingolipiden und spezielle zur Differenzierung von Monohexosylceramid-Isomeren auf HPTLC-Platten wurde Laufmittel V verwendet.
Die polareren Cerebroside wurden mit Laufmittel I auf HPTLC-Platten getrennt (Bild 9). Mit der Einführung der HPTLC-Platten konnte die dünnschichtchromatographische Unterscheidung von Glykosphingolipiden mit geringsten Polaritätänderungen entscheidend verbessert werden. Die HPTLC-Platten waren sehr leistungsfähig im Bereich ≤ 10 n Mol Glykosphingolipid.
Sie büßten ihre guten Trenneigenschaften ein, wenn Glykosphingolipide in höheren Konzentrationen aufgetragen wurden, um sie mit Farbreagenzien lokalisieren zu können.

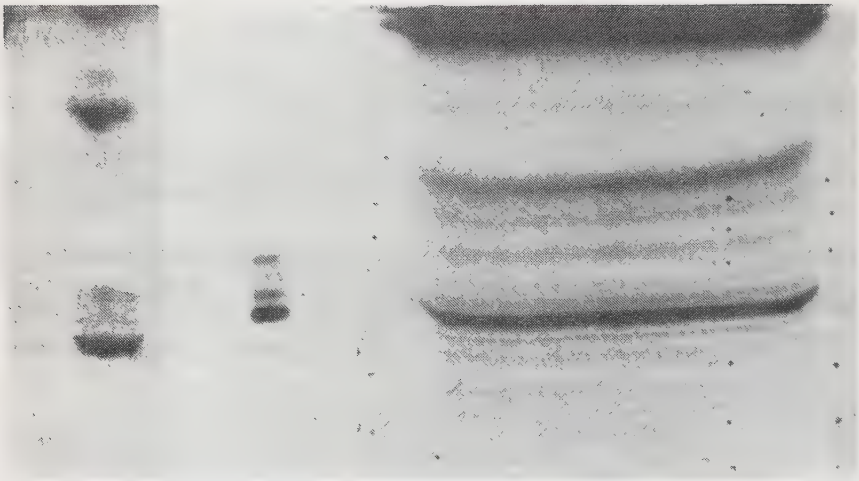
Für die hier entwickelte Analysenmethode waren die HPTLC-Platten hervorragend geeignet, da die dünnschichtchromatographisch getrennten ^{3}H-Glykosphingolipide mittels der Autoradiographie lokalisiert werden konnten.

2.2.7.3. Selektiver Neuraminsäureabbau

Die Neuraminidase vibrio cholerae ist nicht in der Lage alle vorkommenden Neuraminsäurereste im Kohlenhydrateil von Gangliosiden abzuspalten.

Neuraminsäure in 3-Stellung einer 4'-substituierten Galaktose ist gegen das Enzym stabil. Eine solche Verknüpfungs-

Bild: 5



a) b) c)

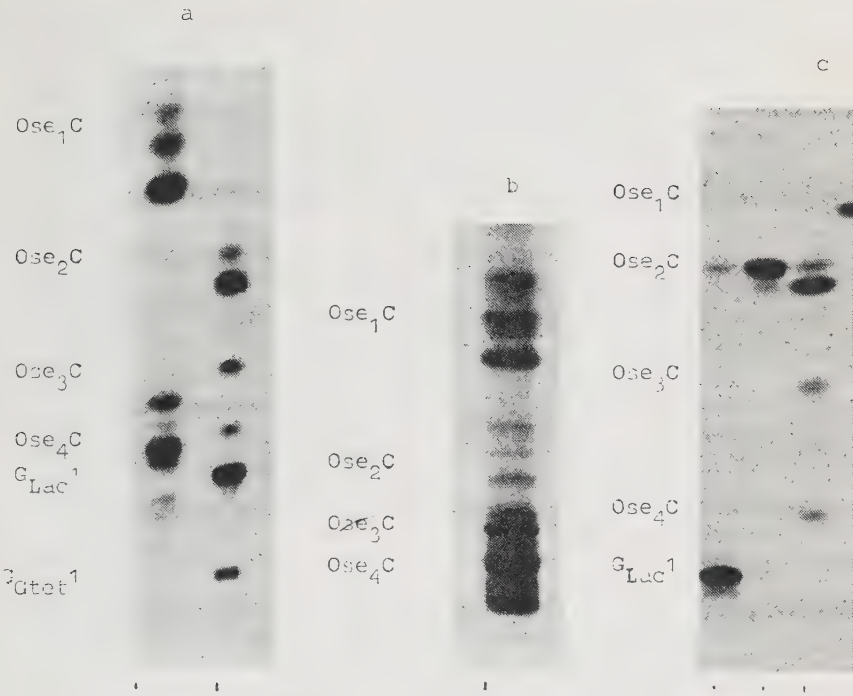
Vergleich verschiedener dünnschichtchromatographischer Trennsysteme zur Trennung der G_{Lac}1-Ganglioside der Probe 1B

a) Kieselgelfertigplatten (E. Merck), Kieselgel 60, 5 x 10 cm,
Laufmittel: $CHCl_3$: Methanol : Wasser (60:35:8, v/v).
Angefärbt mit -Naphtol und Schwefelsäure, 5 min. 120 °C

b) Kieselgelfertigplatten (E. Merck), Kieselgel 60, 5 x 10 cm,
Laufmittel: $CHCl_3$: Methanol : Wasser (60:35:8, v/v).
Autoradiogramm

c) HPTLC-Platten (E. Merck)
Laufmittel: $CHCl_3$: Methanol : Wasser : conz. NH_3
(60:35:6:2, v/v)
Autoradiogramm:
Film: RP-X-Omat Kodak, 72 h, -78 °C

Bild: 9



neutrale Glykosphingolipide des Rattendarms — Standard — neutrale Glykosphingolipide des Rattendarms — Standard

Vergleich der Trennleistung von normalen Kieselgelplatten mit HPTLC-Platten

a = Kieselgelfertigplatte, Kieselgel 60 (E. Merck)
b und c = HPTLC-Platten (E. Merck)
Laufmittel: a und c: $CHCl_3$: CH_3OH : H_2O (60:35:8, v/v)
+ 20 mg $CaCl_2$ pro 100 ml Solvent
b: $CHCl_3$: CH_3OH : conz. NH_3 (7:20:1,8:0
d: $CHCl_3$: CH_3OH : H_2O (65:25:4, v/v)
+ 20 mg KCl pro 100 ml Solvent

weise wurde bisher in den folgenden vier Gangliosiden aufgefunden:

II^3NeuAc-GgOse$_3$-Cer,
II^3NeuAc-GgOse$_4$-Cer,
IV^2Fuc,II^3NeuAc-GgOse$_4$-Cer und
IV^3NeuAc,II^3NeuAc-GgOse$_5$-Cer.

Zum anderen gibt es höhersialyilierte Ganglioside, die entweder zu diesen vier Gangliosiden oder zu sialinsäurefreien neutralen Glykosphingolipiden abgebaut werden können.

Mit Hilfe dieser selektiven Neuraminsäureabspaltung und anschließender Trennung in saure und neutrale Glykosphingolipide konnte nach dünnschichtchromatographischer Trennung eine Charakterisierung des Kohlenhydratteiles von Gangliosiden durchgeführt werden (4.1.1.).

So ließ sich am Beispiel des $G_{Lac}1$-Gangliosid zeigen, daß durch Neuraminidasebehandlung das $G_{Lac}1$ zu Dihexosylceramid abgebaut wurde (Bild 10).

2.2.7.4. Partielle Säurehydrolyse der Kohlenhydratteile von Glykosphingolipiden

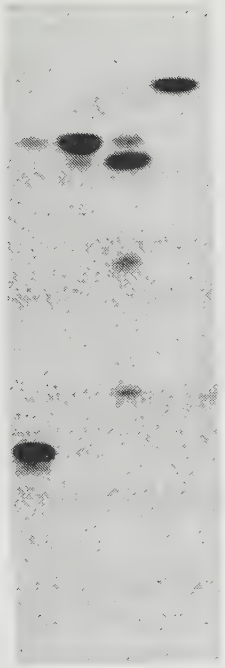
Während der selektive Neuraminsäureabbau Informationen über den Aufbau von Gangliosiden gab, konnten durch Partialhydrolyse Hinweise über die Zusammensetzung der Kohlenhydratkette von neutralen Glykosphingolipiden erhalten werden (23).

Wurde eine partielle Säurehydrolyse von neutralen Glykosphingolipiden durchgeführt, so konnte nach anschließender dünnschichtchromatographischer Trennung im Vergleich mit Standardsubstanzen die Anzahl der verbliebenen Zucker bestimmt werden.

Auf Grund des Wanderungsverhaltens der Glykosphingolipide bei der dünnschichtchromatographischen Trennung konnten dann ebenfalls Aussagen über die Art der Zuckerkomponenten im Kohlenhydratteil gemacht werden (Bild 11).

Bild: 10

Neuraminidasebehandlung von G_{Lac}^1 mit Neuraminidase vibrio cholerae



a = G_{Lac}^1 vor der Neuraminidasebehandlung

b = G_{Lac}^1 nach der Neuraminidasebehandlung

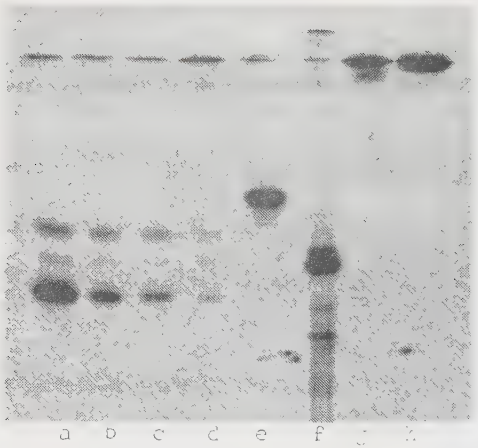
c und d = Glykosphingolipid-Standards

Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (65:25:4, v/v)
+ 20 mg $CaCl_2$ pro 100 ml Solvent

Film: Kodak RP-X-Omat, 72 h, -78 °C

HPTLC-Platten (E. Merck)

Bild: 11



Partielle Säurehydrolyse des Kohlenhydratteils von G[illegible]

a = G_{Gtet}^1 nach 5 min. Hydrolyse mit 1 Teil 1M HCl : CH_3OH und 4 Teile H_2O bei 80 °C
b = G_{Gtet}^1 nach 10 min. Hydrolyse
c = G_{Gtet}^1 nach 20 min. Hydrolyse
d = G_{Gtet}^1 nach 40 min. Hydrolyse
e = Ose_2C und G_{Lac}^1
f = G_{Gtri}^1
g = Ose_2C, Ose_3C, Ose_4C
h = Ose_2C

HPTLC-Platten (E. Merck)

Laufmittel: [illegible] (v/v)

Film: Kodak RP-X-Omat, 48 h, -78 °C

2.2.7.5. Verteilung der ungesättigten Fettsäuren und des Sphingosins im Ceramidteil von Glykosphingolipiden

Die ^{3}H-Glykosphingolipide wurden, wie unter (4.1.1.) beschrieben, hydrolysiert und die Fettsäuren von den Sphingoidbasen getrennt. Hierbei konnte gezeigt werden, daß sich ^{3}H-Stearinsäure bei der Verteilung in der Hexanphase quantitativ und ^{3}H-Sphinganin zu 95 % in der Chloroformphase löst. Aliquots der beiden Phasen wurden im Szintillationszähler gezählt, wodurch die Verteilung der Radioaktivität in den Fettsäuren und in den Sphingoidbasen ermittelt wurde.

Am Beispiel von ^{3}H-G_{Gtet}1 aus Menschenhirn, das zu über 90 % Stearinsäure als Fettsäure-Komponente enthält, konnte dargestellt werden, daß nach Hydrolyse und Verteilung der Fettsäuren und Sphingoidbasen 93 % der Radioaktivität in der Sphingoidbasenfraktion und unter 4 % der Radioaktivität in der Fettsäurefraktion zu messen waren.

Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, daß der überwiegende Teil der Fettsäuren als gesättigte Verbindungen neben einem großen Anteil von ungesättigten Sphingoidbasen im Ceramidteil vorliegt. Dieser Befund stimmt mit früher in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein (36).

2.2.7.6. Semiquantitative Bestimmung mittels eines internen Standards

Dünnschichtchromatographisch getrennte ^{3}H-Glykosphingolipide und der interne Standard wurden einzeln hydrolysiert und die Fettsäuren von Sphingoidbasen getrennt (4.1.1.).

Mit Hilfe des internen Glykosphingolipid-Standards, dessen Gehalt an Sphingosin bekannt war, konnte nach Vergleich der Radioaktivität in den Sphingoidbasenfraktionen der Standard- und Proben-Glykosphingolipide, die die gleiche spezifische

Radioaktivität pro tritiierte Doppelbindung aufwiesen, der Sphingosingehalt der Probe bestimmt werden.
Über den Gehalt an Sphingosin, der innerhalb der verschiedenen Glykosphingolipid-Spezies eine gewisse Variation aufweist, konnte die Konzentration der Proben-Glykosphingolipide semiquantitativ bestimmt werden.
Bei einer Probe von 90 n Mol $G_{Lac}1$ konnten 80 n Mol mit dieser Methode wiedergefunden werden (Tabelle XVI).

2.2.8. Prüfung der Genauigkeit und der Reproduzierbarkeit der Analysenmethode im Mikromolmaßstab und Durchführung der Analysenmethode im Nanomolmaßstab

Durch Zusatz von ^{3}H-Galaktosylceramid und ^{3}H-$G_{Lac}1$ zu gefriergetrockneter Rattenmilz konnte bei drei parallelen Aufarbeitungen die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit des Trennungsganges ermittelt werden (4.1.2.).
Um neben der Messung der Radioaktivität auch die Möglichkeit zu haben, die Glykosphingolipide auf dem Dünnschichtchromatogramm mit konventionellen Anfärbeverfahren nachzuweisen, war es nötig, einen relativ größeren Ansatz von 160 mg Rattenmilz, der 2 - 3 µ Mol Gesamt-Glykosphingolipide enthielt, zu extrahieren.
Dabei konnte nach dem Trennungsgang von dem zugesetzten ^{3}H-Galaktosylceramid 83,2 % und vom ^{3}H-$G_{Lac}1$ 84,9 % wiedergefunden werden.

Die Reproduzierbarkeit der Werte der drei Parallelversuche war gut. Der Mittelwert der Abweichungen vom statistischen Mittelwert betrug 7,7 %, wobei die maximale Abweichung 11,4 % und die minimale Abweichung 4,7 % war.

Es war verständlich, daß das Monohexosylceramid als unpolarster Vertreter der Glykosphingolipide zu einem geringen Teil in Äther gelöst wurde, wie Bild 3 zeigt.
Die polaren Glykosphingolipide, wie z. B. das Dihexosylceramid, wurden unter diesen Bedingungen schon nicht mehr in absolutem Diäthyläther gelöst.

Tabelle: II Verluste bei der Isolierung von Glykosphingolipiden und anschließender Trennung in neutrale und saure Komponenten

Text	Verlust in %
nach Extraktion der Glykosphingolipide	1,7
nach Peracetylierung	1,4
nach Florisil-Reinigung	3,9
nach Dialyse	1,8
nach Ätherfällung	4,7
nach Trennung an DEAE-Sephadex: neutrale Glykosphingolipide	3,1
saure Glykosphingolipide	4,9
Gesamt-Verlust bezogen auf Monohexosylceramid	16,8
Gesamt-Verlust bezogen auf $G_{Lac}{}^{1}$	15,1

Der endgültig ausgearbeitete Trennungsgang wurde mit Proben der Größenordnung von 1 mg gefriergetrockneten Zellen als Ausgangsmaterial durchgeführt (4.1.2.). Eine solche Menge an Zellmaterial war noch ausreichend, um ein sicheres Analysenergebnis zu gewährleisten.

2.3. Diskussion der Glykosphingolipid-Analysenmethode

Die hier beschriebene Analysenmethode erlaubt es, zelluläre Glykosphingolipide zu isolieren und durch Tritiummarkierung ihre Erfassungsgrenze soweit herabzusetzen, daß Glykosphingolipide noch im Nanomol-Bereich charakterisiert und semiquantitativ bestimmt werden können. Darüberhinaus können ebenso Phospholipide erfaßt werden.

Die in dieser Methode verwendeten Lösungsmittelgemische zur Extraktion von Glykosphingolipiden aus Zell- oder Gewebsmaterial bestehen aus Chloroform, Methanol und Wasser. Andere Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran bieten gegenüber diesen Lösungsmitteln keinerlei Vorteile bei der Extraktion zellulärer Glykosphingolipide.
Wird gefriergetrocknetes Probenmaterial nur mit Chloroform-Methanol-Gemischen extrahiert, so kann keine vollständige Extraktion der Glykosphingolipide erreicht werden. Verluste von ca. 10 % der Glykosphingolipide sind dabei unvermeidlich.
Durch Zusatz von Wasser zum Extraktionsmittel kann eine quantitative Extraktion zellulärer Glykosphingolipide erzielt werden.

Eine Anreicherung und Vortrennung in neutrale und saure Komponenten durch eine Verteilung der Glykosphingolipide zwischen einer Wasser- und Chloroformphase, wie von Folch (18) und Suzuki (19) beschrieben, verläuft nicht quantitativ. Nach Angaben von Suzuki (19) lösen sich z.B. 13 % des Gangliosids $G_{Gtri}1$ bei der Trennung in der Chloroformphase, in der die neutralen Glykosphingolipide angereichert werden. Ebenso verteilen sich auch neutrale Glykosphingo-

lipide, bei der Phasentrennung in der Wasserphase, in der sich vor allem Ganglioside lösen.
Da für die Charakterisierung von Glykosphingolipiden mit dieser Methode eine quantitative Trennung in neutrale und saure Komponenten unerläßlich ist, werden die Glykosphingolipide nach ihrer Reinigung an Florisil mit Hilfe der Austauschchromatographie nach Ledeen et.al. (22) getrennt.

Die von Saito und Hakomori beschriebene Prozedur (21) zur Reinigung peracetylierter Glykosphingolipide an Florisil mußte verändert werden, da nach der von den Autoren beschriebenen Methode weder eine vollständige Abtrennung des Cholesterins, noch eine quantitative Eluierung der peracetylierten Glykosphingolipide erzielt werden konnte. Um mehr als 95 % der peracetylierten Glykosphingolipide von der Florisilsäule eluieren zu können, mußte das 15-Fache des von den Autoren beschriebenen Elutionsvolumens an DCE-Aceton verwendet werden.

Die Trennung der einzelnen Glykosphingolipide erfolgt bei dieser Methode mittels der Dünnschichtchromatographie und nicht durch säulenchromatographische Trennverfahren.

Die in der Literatur beschriebenen säulenchromatographischen Verfahren zur Trennung der verschiedenen Glykosphingolipide an DEAE-Sephadex (22), DEAE-Cellulose (20), DEAE-Kieselgel (24) oder an Kieselgel (23) sind bisher fast ausschließlich für präparative Isolierungen benutzt worden. All diese Verfahren sind für die quantitative Auftrennung von Glykosphingolipiden im Nanomol-Maßstab den dünnschichtchromatographischen Trennsystemen unterlegen. Darüberhinaus sind sie sehr viel arbeitsaufwendiger und bieten für die hier angestrebte Zielsetzung gegenüber den dünnschichtchromatographischen Verfahren keinerlei Vorteile.

Die Voraussetzung für die qualitative und semiquantitative Bestimmung ist die exakte Lokalisierung der Glykosphingolipide auf dem Dünnschichtchromatogramm. Die Empfindlich-

keit der Lokalisierung dieser Substanzen bestimmt die untere Nachweisgrenze der gesamten Analysenmethode.

Bei den bisher bekannten Methoden zur Lokalisierung von Glykosphingolipiden auf Dünnschichtchromatogrammen werden Farbreagenzien wie z. B. -Naphtol-Schwefelsäure und p-Dimethyl-aminobenzaldehyd (Ehrlichs Aldehyd) verwendet oder eine Verkohlung der Glykosphingolipide durchgeführt, wobei die untere Nachweisgrenze dieser Methoden zwischen 10 und 20 n Mol Glykosphingolipid/cm^2 liegt.

Wird nach Elution der Glykosphingolipide von Dünnschichtchromatographieplatten und anschließender Hydrolyse der Gehalt der Sphingoidbase mit Fluorescamin bestimmt, so kann die Nachweisgrenze auf 1 n Mol Glykosphingolipid gesenkt werden. Mit dieser Fluoreszenz-Methode ist allerdings eine Lokalisierung der Glykosphingolipide auf der Kieselgelplatte nicht durchführbar.

Ein wesentlich empfindlicherer Nachweis von dünnschichtchromatographisch getrennten Glykosphingolipiden läßt sich nach radioaktiver Markierung mittels der Autoradiographie bzw. der Fluorographie erreichen.

Nach Randerath (35) ist es möglich, radioaktive Substanzen noch mit einer Aktivität von 5 - 6 Ci/cm^2 zu lokalisieren.

Soll mit der angestrebten Analysenmethode noch 1 n Mol Glykosphingolipid auf dem Dünnschichtchromatogramm nachgewiesen werden, so ist eine radioaktive Markierungsmethode zu entwickeln, die es erlaubt, Glykosphingolipide mit einer spezifischen Aktivität von 1 Ci/mol darzustellen.

Eine solche Markierung läßt sich mit der von Schwarzmann (33 entwickelten Methode erreichen, bei der die Doppelbindungen im Ceramidteil mit Kaliumbortritiit hydriert werden.

Die natürlich vorkommenden Glykosphingolipide mit gleichen Kohlenhydratteilen enthalten als Fettsäuren stets eine Mischung aus ungesättigten und gesättigten Fettsäuren.

Ebenso liegen die Sphingoidbasen immer zu einem Teil als ungesättigte Aminoalkohole vor. Damit läßt sich stets ein Teil der Glykosphingolipide radioaktiv markieren, wodurch dann bei der dünnschichtchromatographischen Trennung die gesamten Glykosphingolipide mit identischen Kohlenhydratteilen lokalisiert und erfaßt werden können.

Mit den verschiedenen Verfahren zur Charakterisierung des Kohlenhydratteiles der Glykosphingolipide können recht genaue Angaben über Zahl und Art der Zucker und über die Lokalisierung der Neuraminsäure im Kohlenhydratteil der Glykosphingolipide gemacht werden.

Weitere Informationen über die Struktur des Kohlenhydratteiles der Glykosphingolipide können noch durch Kombination von enzymatischer Hydrolyse und totaler Säurehydrolyse mit anschließender Tritiierung der auftretenden reduzierenden Zucker und dünnschichtchromatographischer Analyse erhalten werden.

Mit der angegebenen Analysenmethode sind aber nicht nur detaillierte Aussagen über den Kohlenhydratteil, sondern auch über den Ceramidteil von Glykosphingolipiden möglich. Mit Hilfe des internen Glykosphingolipid-Standards lassen sich Aussagen über das Verhältnis von Doppelbindungen in den Fettsäuren und Sphingoidbasen machen, wodurch auf die Verteilung von ungesättigten Fettsäuren und Sphingosin im Ceramidteil der Glykosphingolipide geschlossen werden kann.

Darüberhinaus ist es möglich, mit Hilfe des internen Standards eine semiquantitative Bestimmung von Glykosphingolipiden durchzuführen.

Diese semiquantitative Analyse beruht auf der Messung des Sphingosingehalts der Probe, wodurch der Gehalt der Glykosphingolipide bestimmt werden kann. Da der Sphingosingehalt in den einzelnen Glykosphingolipid-Spezies gewissen Schwankungen unterworfen ist, kann der Gehalt an Glyko-

sphingolipiden nur mit einer gewissen Fehlergrenze, d. h. semiquantitativ bestimmt werden.

Eine Quantifizierung ist deshalb mit dieser Methode nicht möglich. Aus diesem Grunde wird z. Zt. eine Methode entwickelt (Schwarzmann, Schlemmer, Wiegandt), mit der Glykosphingolipide noch im Pikomol-Bereich quantitativ erfaßt werden können. Sie beruht darauf, daß die Sphingoidbase nach der Hydrolyse mit ^{14}C-Acetanhydrid N-acetyliert wird. Mittels dieser Doppelmarkierung kann dann das Verhältnis von Sphingosin zu Sphinganin und Phytosphingosin ermittelt werden, wodurch exakte Angaben über die Konzentration der Sphingoidbasen und somit über den Gehalt an Glykosphingolipiden in der Probe gemacht werden können. Leider stand diese Methode für die Durchführung der hier beschriebenen Untersuchungen noch nicht zur Verfügung.

Durch die Herabsetzung der Nachweisgrenze mittels der Tritiummarkierung von Glykosphingolipiden können HPTLC-Platten zur dünnschichtchromatographischen Trennung und Charakterisierung optimal eingesetzt werden. Dadurch können noch Glykosphingolipide mit feinsten Polaritätsunterschieden differenziert werden, die mit Kieselgel-60-Dünnschichtchromatographieplatten überhaupt nicht mehr zu differenzieren sind.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode stellt eine der in-vivo-Markierung von Glykosphingolipiden vergleichbare empfindliche Analysenmethode dar. Sie bietet darüberhinaus die Möglichkeit der semiquantitativen Bestimmung von Glykosphingolipiden und in Gegenwart eines internen Fettsäurestandards ebenfalls eine semiquantitative Analyse von Phospholipiden durchführen zu können. Außerdem läßt sich diese Analysenmethode bei Untersuchungen anwenden, bei denen wie zum Beispiel im Falle von Biopsiematerial der Einsatz einer in-vivo-Markierung von Glykosphingolipiden nicht zu vertreten ist.

Ein Nachteil dieser Analysenmethode besteht darin, daß die O-Acetylgruppen einiger selten vorkommender Ganglioside,

die O-Acetyl-Neuraminsäurereste enthalten, verseift werden. Außerdem können solche Glykosphingolipide nicht analysiert werden, die nur gesättigte Fettsäuren enthalten und deren Sphingoidbasen nur aus Sphinganin oder 4D-Hydroxysphinganin bestehen.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, daß sie nicht nur wie andere Methoden im Mikromolmaßstab anwendbar ist, sondern ihre volle Leistungsfähigkeit erst im Nanomol-Bereich entfaltet.

Diese Analysenmethode ist gut reproduzierbar und gewährleistet nahezu eine quantitative Isolierung zellularer Glykosphingolipide.

Die untere Nachweisgrenze liegt für Glykosphingolipide bei 100 p Mol, bezogen auf eine spezifische Aktivität von 1 µCi pro n Mol ^{3}H-Glykosphingolipid.

Eine empfindlichere Analysenmethode bei gleichzeitiger Charakterisierungsmöglichkeit ist nach meiner Kenntnis der Literatur für Glykosphingolipide nicht publiziert.

Damit ist sie geeignet, in Abhängigkeit von Veränderungen spezieller Zellmembranfunktionen Glykosphingolipidänderungen studieren zu können.

3. Anwendungsbeispiele der Analysenmethode

3.1. Einleitung

Als Modell für eingehende Untersuchungen von Glykosphingolipidveränderungen in Abhängigkeit von Änderungen der Membranfunktionen wurde der Rattendarm gewählt.

Der Rattendarm bietet den Vorteil, daß er einerseits einen relativ hohen Gehalt an Glykosphingolipiden in den Membranen der Mukosazellen enthält, wobei der Anteil von Glykosphingolipiden in der für Resorptionsvorgänge besonders spezialisierten Mikrovilli-Membran ca. 20 % der Gesamtlipide beträgt (37). Dadurch liegt die Vermutung nahe, daß den Glykosphingolipiden eine Bedeutung bei der Resorption von Nährstoffen zukommen könnte.

Andererseits bietet der Rattendarm den Vorteil, daß die enteralen Resorptionsverhältnisse durch Änderung der Nährstoffversorgung des Darms relativ einfach verändert werden können. Darüberhinaus bietet der Darm den zusätzlichen Vorteil, daß innerhalb von etwa 60 h (38,39) die Mukosazellen durch neue genetisch gleichartige Mukosazellen ersetzt werden.

Wird die Nährstoffversorgung des Darms für diesen Zeitraum umgestellt, so kann davon ausgegangen werden, daß die "neuen" Mukosazellen auf ihrer Wanderung aus dem Kryptenbereich zur Zottenspitze unter veränderten Stoffwechselbedingungen der Zelle den Prozeß ihrer Zelldifferenzierung (40) durchlaufen.

Mit diesem Modell kann an genetisch einheitlichem Zellmaterial unter physiologischen Bedingungen der Einfluß von diätetischen Maßnahmen auf den funktionalen Zustand der Mukosazellen bei gleichzeitiger Analyse der Glykosphingolipide der Zellmembran untersucht werden.

Gelingt es durch eine solche Versuchsanordnung eine funktionale Änderung der Mukosazellen mit einer Änderung der Glykosphingolipide ihrer Zellmembranen korrelieren zu

können, so ließen sich Informationen über die Membranfunktion dieser Glykosphingolipide erhalten.

Ausgehend von den Arbeiten von Kershaw et.al. (41) und vielen anderen Autoren (42-48), die gezeigt haben, daß sich die enteralen Resorptionsbedingungen durch Änderung der Nährstoffversorgung des Darms verändern lassen, sollten Rattenkollektive unterschiedlichen Ernährungsbedingungen unterworfen werden.
Es sollten an benachbarten Darmsegmenten des proximalen Rattenjejunums in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Nährstoffversorgung die aktiven Transporte für D-Glucose und L-Leucin gemessen und parallel dazu die Glykosphingolipide dieser Jejunumsegmente bestimmt werden.
Dabei wurden die wichtigsten Veränderungen der Glykosphingolipidmuster der unterschiedlich ernährten Jejunumsegmente auf ihre molekularen Unterschiede hin untersucht und die Ergebnisse in vergleichenden Untersuchungen mit Standardmethoden der Glykosphingolipidanalysen geprüft werden. Darüberhinaus sollte der Einfluß von exogenen Gangliosiden auf den aktiven Transport von D-Glucose und L-Leucin an normalernährten Ratten untersucht werden.

Stellt die unterschiedliche Nährstoffversorgung eine Form des experimentellen Eingriffs zur Veränderung der Darmfunktion unter physiologischen Bedingungen dar, so bildet die Inkubation mit Enterotoxinen eine andere Form des experimentellen Eingriffs, um mögliche Veränderungen der Glykosphingolipide mit Funktionsänderungen des Darms korrelieren zu können.

Aus diesem Grunde wurden von Dr. Stärk und Dr. Ronneberger (Behringwerke AG) Kaninchendärme mit Cholera- und Escherichia Coli-Toxin inkubiert und die qualitativen Änderungen der Darmglykosphingolipide untersucht.

Darüberhinaus wurde die Analysenmethode an weiteren Untersuchungsobjekten mit Mengen von wenigen Milligramm Gewebs- oder Zellmaterial angewendet, wobei einmal Spinalganglien eines Göttinger Minischweines, das nach pharmakologischer

Behandlung mit Chlorochin histologisch typische Veränderungen einer Speicherdystrophie aufwies, auf qualitative Änderungen der Glykosphingolipide untersucht wurden. Zum anderen wurden Glykosphingolipid-Untersuchungen unterschiedlicher Populationen peripherer Humanlymphozyten durchgeführt.

3.2. Ergebnisse

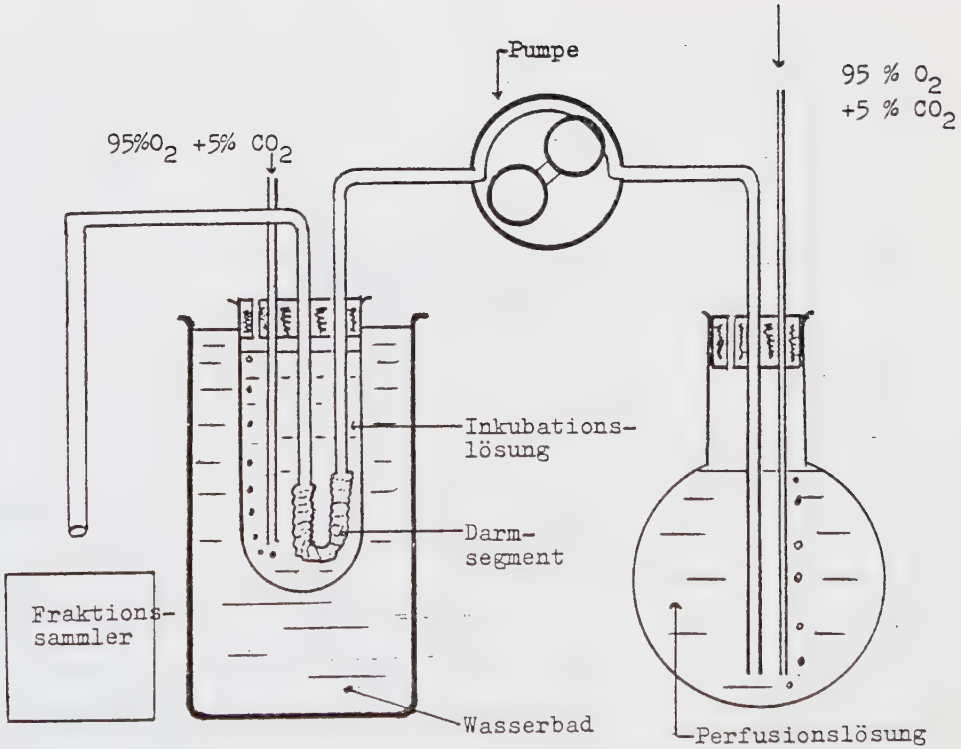
3.2.1. Untersuchung der Resorption und der Glykosphingolipide des Rattendarms

3.2.1.1. Änderung der Resorption von D-Glucose und L-Leucin in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Nährstoffversorgung des Rattendarms

Die Resorptionsmessung wurde nach der Methode von Aeppli-Schmidt, Meinen und Rehner (49,50) und mit der von ihnen entwickelten Apparatur durchgeführt (Fig. 2). Dabei wurde der Transport von D-Glucose und L-Leucin an Rattendärmen, die unterschiedlich ernährt worden waren (Tabelle III) durch eine in vitro-Messung gegen einen Konzentrationsgradienten bestimmt (4.2.2.). Die Ratten wurden entweder mit einer Normalkost oder mit einer protein- und fettreichen aber kohlenhydratarmen Diät, die isoenergetisch zur Normalkost war, gefüttert (4.2.1.). Dabei stieg die Resorption von D-Glucose um 54 % und die von L-Leucin um 220 % gegenüber den normalernährten Ratten an (Tab. IV, V, Fig. 3, 4). Entzog man den Ratten das Futter für 60 h (4.2.1.), und unterwarf sie dann der Resorptionsmessung, so war eine Zunahme des Glucosetransportes um 62 % und des Leucintransportes um 258 % messbar (Tab. IV, V, Fig. 3, 4). Fütterte man die Ratten nach der Hungerperiode 60 h lang wieder mit Normalkost (4.2.1.), so reduzierte sich die Resorptionszunahme für Glucose wieder auf +25 % und für Leucin auf +48 % gegenüber den Normalwerten (Tab. IV, V, Fig. 3, 4).

Tabelle: III Veränderung der Nährstoffversorgung der Ratten (4.2.1.)

Gruppe 1 =	Probe 1	10 Tage Normal-kost	60 h Normalkost	60 h Normalkost
Gruppe 2 =	Probe 2	"	60 h proteinreiche kohlenhydratarme Diät	60 h Futterentzug
Gruppe 3 =	Probe 3	"	60 h Futterentzug	60 h Normalkost
Gruppe 4 =	Probe 4	"	60 h Normalkost	60 h proteinreiche kohlenhydratarme Diät
Gruppe 5 =	Probe 5	"	60 h Normalkost	60 h Futterentzug
	Probe 6	"	60 h proteinreiche kohlenhydratarme Diät	60 h Normalkost



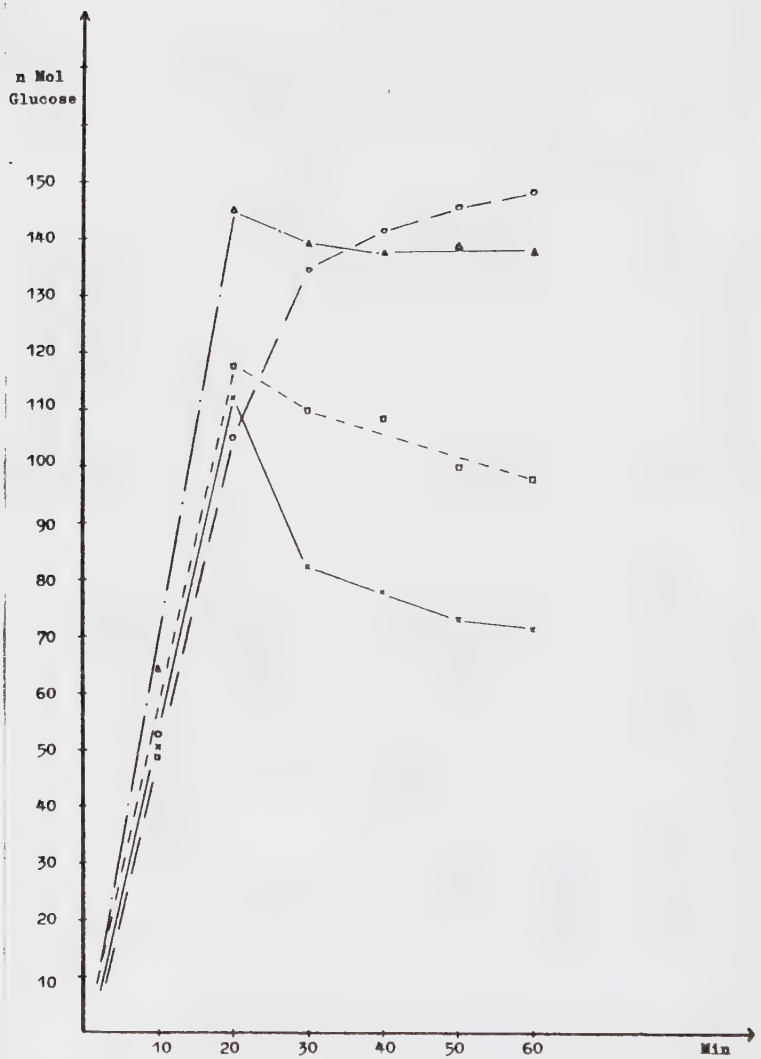
Figur: 2 Die Resorptions-Apparatur nach Aeppli-Schmidt, Meinen

Tabelle: IV Mukosa-Serosatransport von Glucose gegen einen Konzentrationsgradienten

angegeben in: $\frac{\text{n Mol Glucose}}{\text{cm Jejunum} \cdot 10 \text{ min}}$

Zeit (min.)	Normaltiere	Hungertiere
0 - 10	51,5 ± 1,3	65,0 ± 7,9
10 - 20	112,0 ± 3,5	144,8 ± 5,6
20 - 30	82,7 ± 17,7	138,8 ± 5,6
30 - 40	78,2 ± 20,5	136,8 ± 10,0
40 - 50	73,2 ± 10,8	138,3 ± 16,5
50 - 60	71,2 ± 11,3	136,2 ± 18,0
	Summe: 468,8 ± 65,1	Summe: 759,9 ± 63,6

Zeit (min.)	Diättiere	Rückfütterung von Hunger auf Normalkost
0 - 10	52,0 ± 3,6	48,0 ± 3,7
10 - 20	105,0 ± 5,6	118,2 ± 5,3
20 - 30	131,2 ± 10,8	110,1 ± 8,1
30 - 40	141,8 ± 12,3	109,5 ± 3,3
40 - 50	145,3 ± 8,7	99,8 ± 5,8
50 - 60	148,4 ± 8,5	98,5 ± 7,2
	Summe: 723,7 ± 49,5	Summe: 584,1 ± 33,4



Figur: 3 Mukosa-Serosa-Transport von Glucose gegen einen Konzentrationsgradienten

angegeben in $\frac{\text{n Mol Glucose}}{\text{cm Jejunum . 10 min}}$

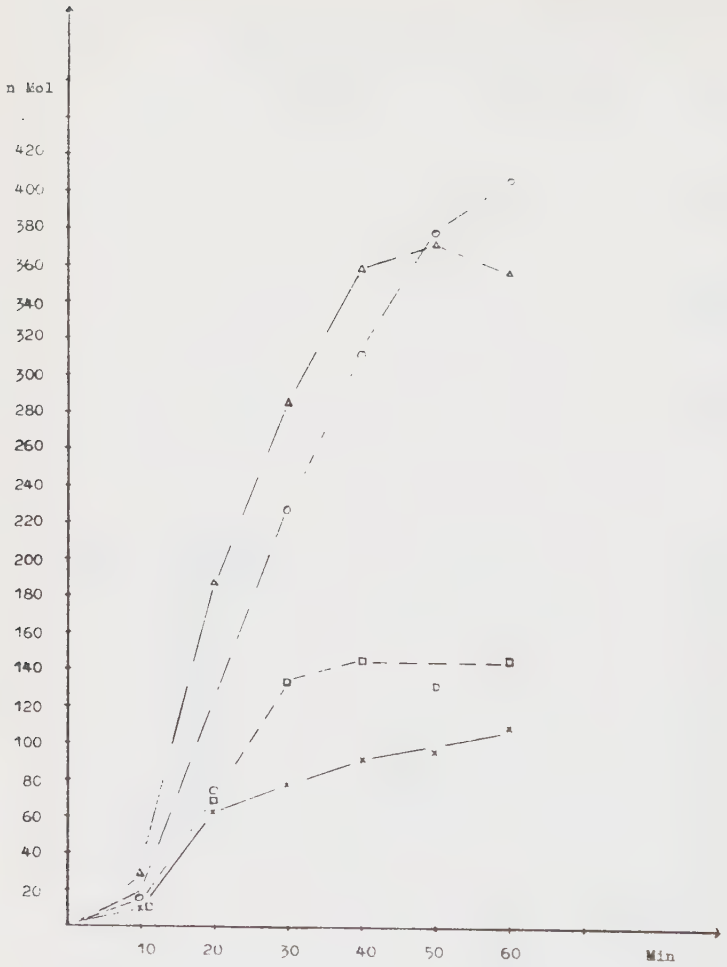
Normal ernährte Ratten (X - X); normal ernährte Ratten, denen das Futter entzogen wurde (Δ - Δ); Ratten, die mit der proteinreichen, kohlenhydratarmen Diät ernährt wurden (O - O); Ratten, die nach Entzug des Futters wieder mit Normalkost ernährt wurden (□ - □)

Tabelle: V Mukosa-Serosatransport von Leucin gegen einen Konzentrationsgradienten

angegeben in: $\frac{\text{n Mol Leucin}}{\text{cm Jejunum} \cdot 10\ \text{cm}}$

Zeit (min.)	Normaltiere	Hungertiere
0 - 10	10,5 ± 1,2	29,9 ± 11,8
10 - 20	61,4 ± 3,5	187,2 ± 45,0
20 - 30	78,7 ± 21,1	284,9 ± 47,1
30 - 40	90,7 ± 27,0	358,5 ± 95,4
40 - 50	96,5 ± 11,4	371,8 ± 97,5
50 - 60	105,8 ± 11,5	355,5 ± 98,3
	Summe: 444,0 ± 75,7	Summe: 1587,8 ± 395,1

Zeit (min.)	Diättiere	Rückfütterung von Hunger auf Normalkost
0 - 10	15,3 ± 4,5	14,8 ± 1,6
10 - 20	75,9 ± 9,4	75,8 ± 6,5
20 - 30	228,0 ± 46,4	138,4 ± 3,6
30 - 40	312,1 ± 63,5	148,0 ± 9,5
40 - 50	377,2 ± 53,1	132,0 ± 11,4
50 - 60	407,1 ± 28,2	147,2 ± 9,4
	Summe: 1415,5 ± 205	Summe: 656,2 ± 42



Figur: 4 Mukosa-Serosa-Transport von Leucin gegen einen Konzentrationsgradienten

angegeben in $\frac{\text{n Mol Leucin}}{\text{cm Jejunum . 10 min}}$

Normal ernährte Ratten (X - X); normal ernährte Ratten, denen das Futter entzogen wurde (Δ - Δ); Ratten, die mit der proteinreichen, kohlenhydratarmen Diät ernährt wurden (O - O); Ratten, die nach Entzug des Futters wieder mit Normalkost ernährt wurden (□ - □)

Tabelle: VI Mukosa-Serosatransport von Glucose bei Normaltieren gegen einen Konzentrationsgradienten angegeben in:

$$\frac{\text{n Mol Glucose}}{\text{cm Jejunum} \cdot \text{10 min}}$$

1) In Gegenwart von 17 n Mol Gangliosid ($G_{Gtet}{}^{1}$, $G_{gtet}{}^{2a}$, $G_{Gtet}{}^{2b}$) pro ml Inkubationslösung:

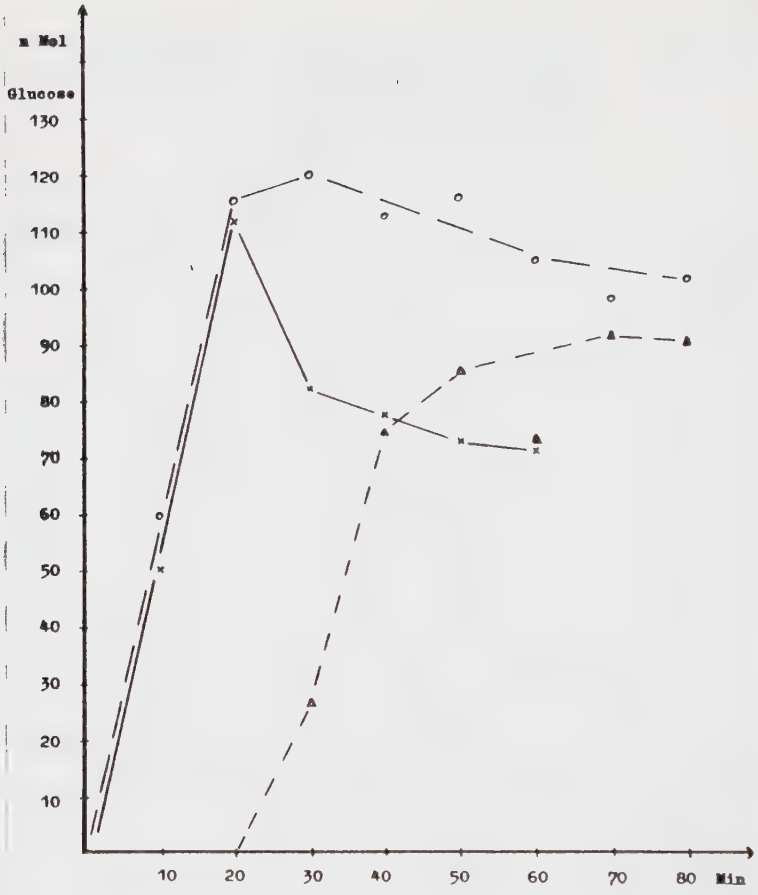
Zeit (min.)	
0 - 10	60,2 ± 2,3
10 - 20	115,4 ± 3,9
20 - 30	120,1 ± 4,0
30 - 40	112,2 ± 5,3
40 - 50	115,5 ± 3,1
50 - 60	104,0 ± 2,1
60 - 70	97,6 ± 5,6
70 - 80	101,3 ± 3,4

Summe (0 - 60 min.): 627,1 ± 26,4

2) Nach Vorinkubation des Darmsegmentes in Krebs-Ringer-Lösung, der 17 n Mol Gangliosid ($G_{Gtet}{}^{1}$, $G_{Gtet}{}^{2a}$, $G_{Gtet}{}^{2b}$) pro ml zugesetzt wurde:

Zeit (min.)	
0 - 10	- -
10 - 20	- -
20 - 30	27,7 ± 12,6
30 - 40	74,8 ± 5,9
40 - 50	85,1 ± 3,4
50 - 60	72,0 ± 3,2
60 - 70	91,7 ± 18,2
70 - 80	90,8 ± 20,2

Summe: 442,1 ± 63,5



Figur: 5 Mukosa-Serosa-Transport von Glucose gegen einen Konzentrationsgradienten

angegeben in $\frac{\text{n Mol Glucose}}{\text{cm Jejunum . 10 cm}}$

1) In Gegenwart von 17 n Mol Ganglioside $G_{Gtet}1$, $G_{Gtet}2a$ und $G_{Gtet}2b$ pro ml (O - O).
2) Nach Vorinkubation des Darmsegmentes in Krebs-Ringer-Lösung, der 17 n Mol Ganglioside $G_{Gtet}1$, $G_{Gtet}2a$ und $G_{Gtet}2b$ pro ml zugesetzt wurde (Δ - Δ).

Kontrolle ≙ normal ernährte Ratten (X - X).

Tabelle: VII Mukosa-Serosatransport von Leucin bei Normaltieren gegen einen Konzentrationsgradienten angegeben in:

$$\frac{\text{n Mol Leucin}}{\text{cm Jejunum} \cdot \text{10 min}}$$

1) In Gegenwart von 17 n Mol Gangliosid ($G_{Gtet}1$, $G_{Gtet}2a$, $G_{Gtet}2b$) pro ml Inkubationslösung:

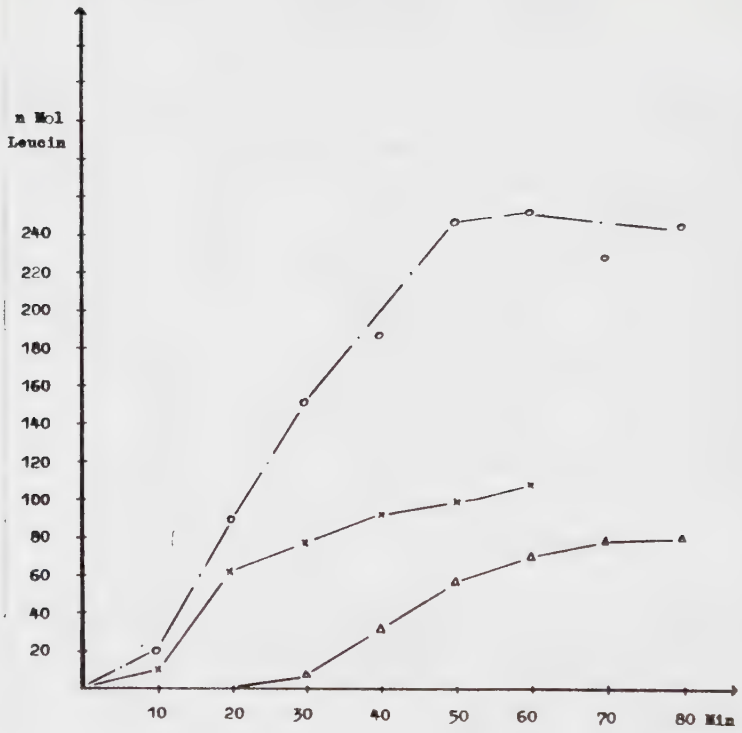
Zeit (min.)	
0 - 10	21,5 ± 1,5
10 - 20	87,4 ± 4,1
20 - 30	149,0 ± 7,0
30 - 40	181,0 ± 9,2
40 - 50	222,3 ± 12,5
50 - 60	227,0 ± 14,7
60 - 70	205,6 ± 13,8
70 - 80	220,3 ± 11,2

Summe (0 - 60 min.): 888,2 ± 62,8

2) Nach Vorinkubation des Darmsegmentes in Krebs-Ringer-Lösung, der 17 n Mol Gangliosid ($G_{Gtet}1$, $G_{Gtet}2a$, $G_{Gtet}2b$) pro ml zugesetzt wurde:

Zeit (min.)	
0 - 10	- -
10 - 20	- -
20 - 30	6,0 ± 1,9
30 - 40	30,4 ± 10,8
40 - 50	54,5 ± 11,9
50 - 60	67,8 ± 10,8
60 - 70	76,8 ± 7,3
70 - 80	77,1 ± 4,6

Summe: 312,5 ± 47,3



Figur: 6 Mukosa-Serosa-Transport von Leucin gegen einen Konzentrationsgradienten

angegeben in $\frac{\text{n Mol Leucin}}{\text{cm Jejunum . 10 cm}}$

1) In Gegenwart von 17 n Mol Ganglioside $G_{Gtet}1$, $G_{tet}2a$ und $G_{Gtet}2b$ pro ml (O - O).
2) Nach Vorinkubation des Darmsegmentes in Krebs-Ringer-Lösung, der 17 n Mol Ganglioside $G_{Gtet}1$, $G_{Gtet}2a$ und $G_{Gtet}2b$ pro ml zugesetzt wurde (Δ - Δ).

Kontrolle $\hat{=}$ normal ernährte Ratten (X - X).

Wurde die Resorptionsmessung der beiden Nährstoffe in Gegenwart einer Mischung von Gangliosiden bestehend aus G_{Gtet}, $G_{Gtet}{}^{2a}$, $G_{Gtet}{}^{2b}$ durchgeführt, so stieg die Resorption für Glucose um 34 % und die für Leucin um 100 % (Tab. VI, VII, Fig. 5, 6).

Wurden die Darmsegmente vor der Resorptionsmessung 20 min. lang in einer Krebs-Ringer-Lösung, die eine Mischung dieser Ganglioside enthielt, vorinkubiert (4.2.1.), so blieb die Resorptionsrate für Glucose mit einer Resorptionszunahme von 5 % fast konstant, während die Resorption für Leucin mit einer Abnahme von 29 % gegenüber den Normalwerten zwar niedriger, aber noch fast im Schwankungsbereich der Resorptionswerte des Normaldarms lag (Tab. VI, VII, Fig. 5, 6).

3.2.1.2. Analyse der Glykosphingolipide in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Nährstoffversorgung des Rattendarms

3.2.1.2.1. Auftrennung und dünnschichtchromatographische Darstellung der Glykosphingolipid-Muster

Es wurden die Glykosphingolipid-Muster der Jejunumsegmente von Ratten untersucht, die mit der Normalkost , mit der proteinreichen und kohlenhydratarmen Diät ernährt wurden, denen das Futter nach Normal- und Diäternährung entzogen wurde und die nach dieser Hungerperiode wieder auf Normalkost umgestellt wurden (4.2.1.).

Dabei zeigten die Jejunumsegmente des Rattendarms wie andere typische extraneurale Organe ein Glykosphingolipid-Muster, das Monohexosyl-, Dihexosyl-, Trihexosylceramid und Globosid als neutrale Glykosphingolipide aufweist (Bild 12). Als saure Glykosphingolipide werden Sulfatid, $G_{Gtet}{}^{1}$, $G_{Lac}{}^{1}$ und möglicherweise noch andere, nicht identifizierte Ganglioside, aufgefunden (Bild 12).

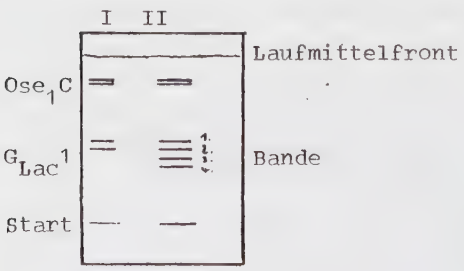
Das Bild 13 zeigt einen detaillierten Vergleich der neutralen Glykosphingolipide (Fraktion A) der Proben 1 - 6.

Die Monohexosylceramide, Dihexosylceramide und die Trihexosylceramide wurden im Dünnschichtchromatogramm jeweils in 3 Banden aufgetrennt. Die Globoside erschienen als Doppelbande. Unterhalb der Globoside sind noch Glykosphingolipid-Banden sichtbar, sogar noch in der Höhe von $G_{Gtet}1$, für die keine Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen.

Der Vergleich der drei Monohexosylceramidbanden zeigt, daß bei dem Diätdarm (4A) und den Hungerdärmen (2A, 5A) die am langsamsten wandernde Bande des Mono- und Trihexosylceramids stärker ausgebildet ist als bei dem Normaldarm 1A und bei 3A.

Bild 14 zeigt den detaillierten Vergleich der sauren Glykosphingolipide (Fraktion B) der Proben 1 - 6.

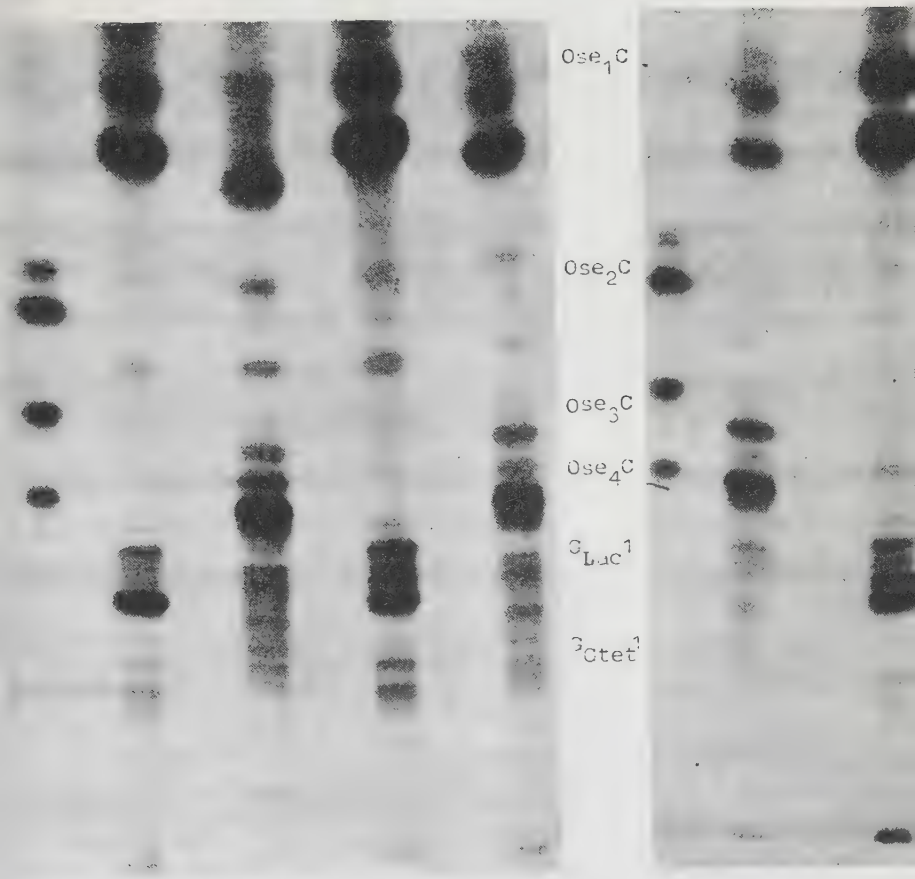
Die Doppelbande, die in der Höhe des Monohexosylceramids lief, wurde von dem zugesetzten internen Galaktosylceramidstandard (2.2.5.) hervorgerufen. Die deutlichsten Unterschiede innerhalb der B-Fraktionen der Proben 1 - 6 traten in vier Banden auf, die in der Höhe von $G_{Lac}1$ liefen. Zum Zwecke der Charakterisierung wurde die am schnellsten wandernde Bande als die Bande 1 und die dazu langsamer wandernden Banden als die Banden 2, 3 und 4 bezeichnet.



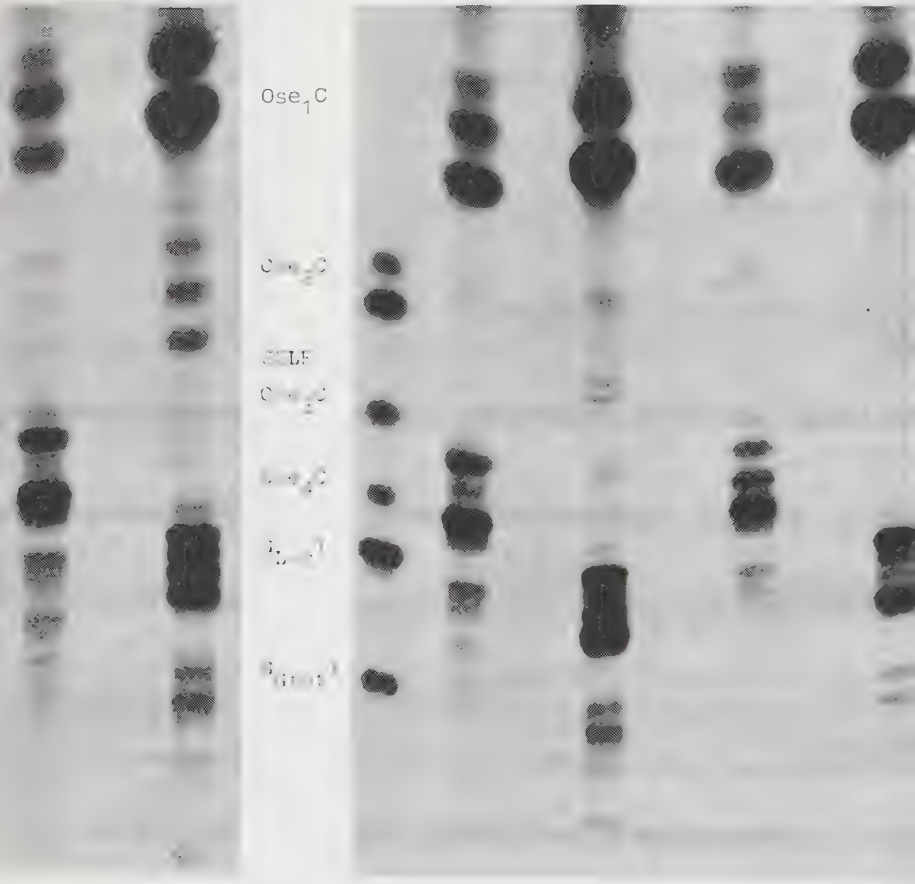
Dünnschichtchromatogramm: I Standard (Ose_1C, $G_{Lac}1$);
II vier $G_{Lac}1$-Banden

Die Intensität dieser vier Banden nahm beim Normaldarm (1B) von der Bande 1 zur Bande 4 zu.

Bild: 12



Stand. = Standardsubstanzen
Kieselgelfertigplatten (Kieselgel 60, E. Merck),
Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (60:35:8, v/v)
+ 10 mg $CaCl_2$ pro 100 ml Solvent
PPO-Beschichtung, Film: Kodak XR-X-Orbit, Belichtung: 72 h



Neutrale und saure Glykosphingolipide der unterschiedlich ernährten Rattenjejunumsegment

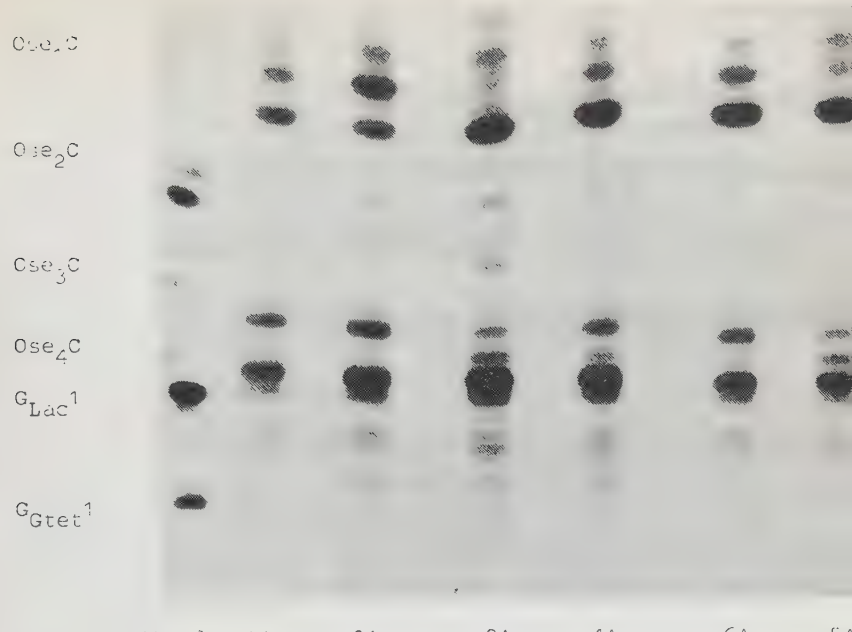


Bild: 13 Neutrale Glykosphingolipide (Fraktion A)

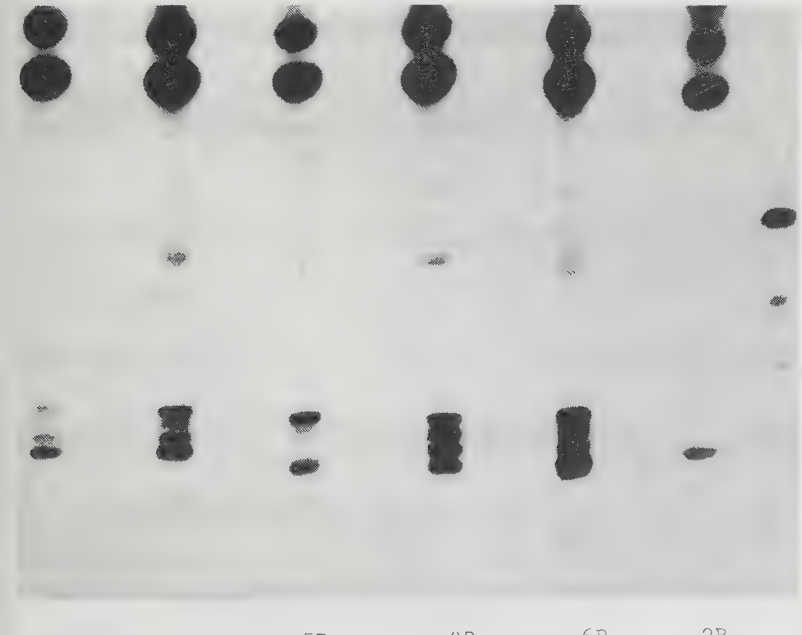


Bild: 14 Gangliosid-Sulfatid-Fraktion (Fraktion B)

Im Vergleich dazu war die Intensität der 1. und 4. Bande des Diätdarms (4B) und des Hungerdarms (5B) wesentlich stärker als die der 2. und 3. Bande. Bei dem Hungerdarm (2B) waren die 2. und 3. Bande kaum zu erkennen und die 1. Bande war im Vergleich zur 4. Bande nur sehr schwach ausgebildet.

Bei den Därmen, die jeweils von Hunger und von Diät auf Normalkost umgestellt wurden (3B und 6B), waren die vier Banden fast gleich stark ausgebildet.

Im Bereich der 3 Banden des Dihexosylceramids waren bei 4B, 3B und 6B Schatten zu erkennen, die wahrscheinlich von einer unvollständigen Trennung des Dihexosylceramids aus der jeweiligen Fraktion A herrührten. Die Sulfatidbande war bei 1B schwächer ausgebildet als bei den anderen B-Fraktionen.

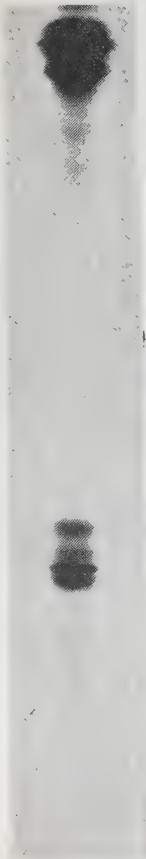
3.2.1.2.2. Spezielle Untersuchungen der wichtigsten Glykosphingolipid-Veränderungen und Phospholipidveränderungen

Als Beispiel der wichtigsten Glykosphingolipid-Veränderungen wurden die Gangliosid, die als vier Banden (Bild 12, 14) in der Höhe des G_{Lac}^{1}-Standards laufen auf ihre molekularen Unterschiede hin untersucht.

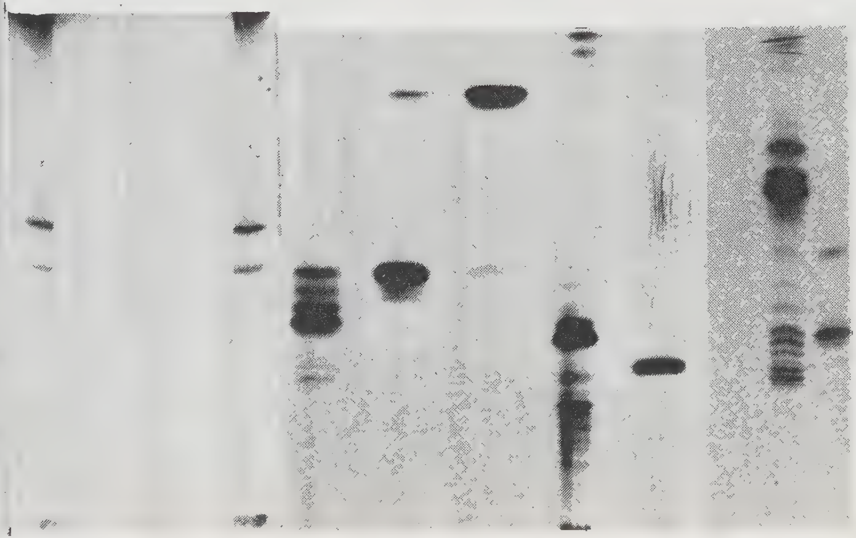
Dünnschichtchromatographische Trennung

Das Verhalten der vier Banden, die in der Höhe des G_{Lac}^{1}-Standards laufen, wurde unter verschiedenen Laufmittelbedingungen untersucht (Bild 15, 16, 17 und 18).

Die Bande 4 zeigte im Vergleich zu den anderen drei Banden in den verschiedenen Laufmitteln ein anormales Verhalten. Sie erschien bei der Trennung mit dem Laufmittel Nr. VI (4.1.1.) oberhalb (Bild 15), mit dem Laufmittel Nr. IV unterhalb der Bande 3 (Bild 18) und mit dem Laufmittel



Wanderungsverhalten der Gangliosid-Banden in der Höhe des G_{Lac}1-Standards der Probe 1B bei unterschiedlichen dünnschichtchromatographischen Trennverfahren



Legende:

Bild: 15 Probe 1B
Kieselgelfertigplatte (Merck)
20 x 20 cm Kieselgel 60;
Laufmittel: n-Butanol :
Pyridin : Wasser (9:6:4,v/v)
+ 0,1 % w/v KCl

Bild: 16 Probe 1B
Kieselgelfertigplatte (Merck)
5 x 10 cm Kieselgel 60;
Laufmittel: Chloroform :
Methanol : Wasser
(60:35:7,v/v)

Bild: 17
HPTLC-Platte (Merck) 5x10 cm;
Laufmittel: Chloroform :
Methanol : Wasser (60:3[illegible]
+ 20 mg $CaCl_2 \cdot H_2O$ pro 1[illegible]
Solvent.
a) = Probe 1B
b) = G_{Lac}1-Standard
c) = Ose_2C-Standard
d) = G_{Stw}1-Standard
e) = $G_{Gröt}$1-Standard

Bild: 1[illegible] Probe 1B
HPTLC-Platte (Merck) 5x10 cm
Laufmittel: Chloroform :
Methanol : Wasser : C[illegible]
Ammoniak ([illegible]:3[illegible],v/v).
a) = Probe 1B
b) = O[illegible]C-Standard

Nr. III parallel zur schneller wandernden Bande des G_{Gtri}^1-Standards.

In einem Laufmittelsystem, in dem ein etwas unpolareres Laufmittel Nr. VIII verwendet wurde (Bild 16), konnten die in den Bildern 12, 14 und 17 auftretenden vier Banden nur in zwei Banden aufgetrennt werden.

Die Versuche der dünnschichtchromatographischen Trennung unter verschiedenen Laufmittelbedingungen zeigten, daß von den Gangliosiden, die im Dünnschichtchromatogramm in der Höhe des aus Menschenhirn isolierten G_{Lac}^1-Standard wanderten, die beiden am schnellsten laufenden Ganglioside-Banden ein identisches Wanderungsverhalten wie der G_{Lac}^1-Standard aufwiesen.

Die anderen Banden dieser Proben-Ganglioside wanderten langsamer als dieser G_{Lac}^1-Standard, wobei die im Bild 17a sichtbare vierte Bande unter bestimmten Laufmittelbedingungen schon fast parallel mit dem G_{Gtri}^1-Standard lief.

Da diese Proben-Ganglioside in anderen Laufmitteln nicht immer in vier Banden aufgetrennt und die am langsamsten wandernde Bande auch nicht immer in einer Höhe mit dem G_{Gtri}-Standard lief, bestand die Möglichkeit, daß es sich bei den Gangliosiden dieser Bande nicht um Trioseganglioside handelt, sondern um G_{Lac}^1-Ganglioside mit einem polareren Ceramidteil.

Endgültige Klarheit über die Anzahl der Zuckerkomponenten der Kohlenhydratteile dieser Ganglioside schaffte jedoch erst die Neuraminsäureabspaltung mit Neuraminidase (vibrio cholerae).

Abspaltung der Neuraminsäure mit Neuraminidase

Im Bild 19 sind die dünnschichtchromatographisch getrennten vier Ganglioside-Banden der Proben 1B, 2B und 4B vor und nach der Neuraminidasebehandlung dargestellt. Es ist ersichtlich, daß alle vier Banden der drei Proben bis auf geringe Spuren zum Dihexosylceramid abgebaut wurden.

Aus Bild 20 geht hervor, daß die unter bestimmten Bedingungen (Bild 19) als vier Banden aufgetrennten Ganglioside nach dem Neuraminidaseabbau auf drei Dihexosylceramidbanden reduziert wurden.

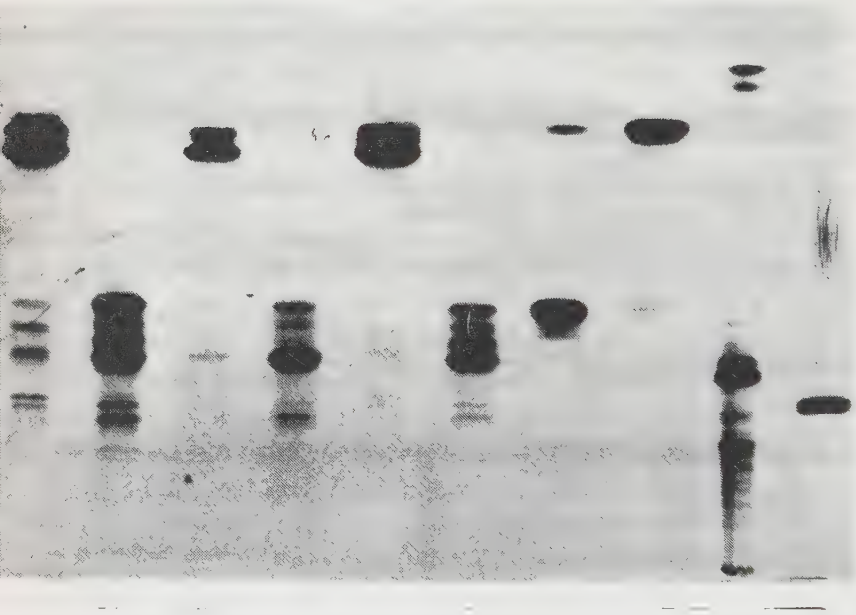
Auf Grund des dünnschichtchromatographischen Wanderungsverhaltens, der Labilität gegenüber Neuraminidase und der neutralen Kohlenhydrat-Grundgerüste konnten diese Gangliosside als ^{3}H-NeuAc-Lac-Ceramide charakterisiert werden. Dadurch wurde eindeutig das Vorhandensein von $G_{Gtri}1$ in der vierten Ganglioside-Bande ausgeschlossen.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den gaschromatographischen Analysen, die als Bestandteile der Kohlenhydratreste dieser Gangliosside Glucose, Galaktose und Neuraminsäure als N-Acetyl- und N-Glykolyl-Derivate nachwiesen.

Die Vereinfachung des Banden-Musters von vier $G_{Lac}1$- auf drei Dihexosylceramidbanden nach der Neuraminsäureabspaltung, ist durch das gleichzeitige Vorkommen von N-Acetyl- und N-Glykolyl-Neuraminsäure im $G_{Lac}1$ erklärbar. Dabei konzentrieren sich wahrscheinlich die durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe polareren N-Glykolyl-Neuraminsäure enthaltenden $G_{Lac}1$-Gangliosiden in der vierten Bande (Bild 19), wodurch auch das besondere Wanderungsverhalten der Ganglioside dieser vierten Bande in den verschiedenen Laufmittelsystemen (Bild 15-18) erklärt werden kann.

Darüberhinaus konnte eine weitere interessante Beobachtung bei der Neuraminsäureabspaltung mit Neuraminidase gemacht werden. Wie Bild 19 zeigt, ist ein geringer Teil der Gangliosside der $G_{Lac}1$-Banden gegenüber Neuraminidase resistent. Dieser Rest von Gangliosiden konnte auch durch mehrfaches Zusetzen von Neuraminidase (vibrio cholerae) nicht abgebaut werden. Durch Trennung der neutralen von den sauren Glykosphingolipiden wurden nach der Neuraminsäureabspaltung zwei Ganglioside-Banden erhalten, die in der Höhe der Bande 1 und 4 des $G_{Lac}1$ laufen (Bild 21). Diese beiden Ganglioside-Banden waren in allen Proben vor (Bild 19). Infolge zu geringer Konzentration konnte keine weitere Charakterisierung durchgeführt werden. Möglicher-

Bild: 15



a b c d e f g h i j

Selektiver Neuraminsäureabspaltung der Ganglioside der Proben 1B, 2B und 4B mit Hilfe der Neuraminidase (vibrio cholerae)

a = 4B nach der Neuraminidasebehandlung
c = 2B " " " "
e = 1B " " " "

b = 4B vor der Neuraminidasebehandlung
d = 2B " " " "
f = 1B " " " "

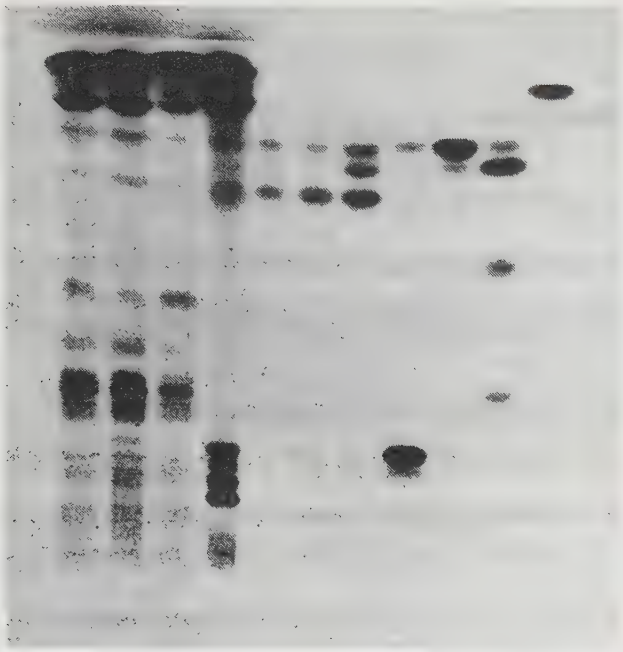
j = G_{Lac}^{1} i = G_{Gtri}^{1}
h = Ose_2C j = G_{Gtet}^{1}

HPTLC-Platten (E. Merck)

Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (60:35:8, v/v)
+ 20 mg $CaCl_2$ pro 100 ml Solvent

PPO-Beschichtung; Film: Kodak RP-X-Omat; Belichtung: 48 h, -78 °C

Bild: 20



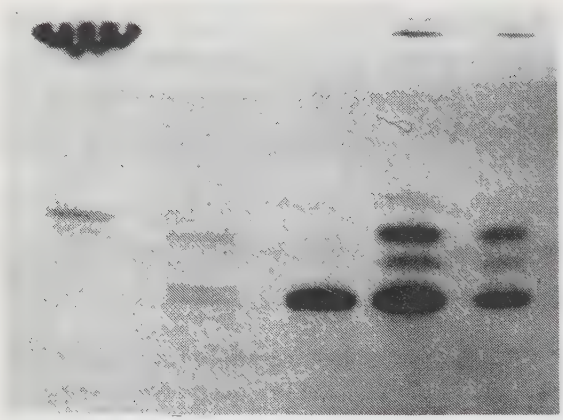
Vergleich der durch Neuraminidasespaltung aus den Ganglioside der Proben 1B, 2B und 4B gewonnenen Glykosphingolipide mit den Cerebrosiden der Fraktionen 1A, 2A und 4A

a = 1A; e = $G_{Lac}1$ von 1B nach Neuraminidasebehandlung
b = 2A; f = $G_{Lac}1$ " 2B " " "
c = 4A; g = $G_{Lac}1$ " 4B " " "
d = 1B;
h = $G_{Lac}1$-Standard; j = Ose_2C-, Ose_3C-, Ose_4C-Standard
i = Ose_2C-Standard; k = Ose_1C-Standard

HPTLC-Platten (E. Merck)

Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (65:25:4, v/v)
+ 20 mg $CaCl_2$ pro 100 ml Solvent

Bild: 2



Gangliotetraosyl-
ceramid
G_{Gtet}
G_{Gtet}^{1}

Vergleich der gegenüber Neuraminidasebehandlung resistenten Ganglioside mit Standardsubstanzen, die durch hydrolytische Spaltung aus G_{Gtet}^{1} gewonnen wurden

Die mit Neuraminidase behandelten Ganglioside wurden der Inkubation in neutrale und saure Komponenten getrennt.

1) Fraktion A = neutrale Glykosphingolipide
2) Fraktion B = saure Glykosphingolipide
3) G_{Gtet}^{1}-Standard
4) Glykosphingolipidgemisch nach 30 min. Hydrolyse mit 100 ul 1M HCl, MeOH + 400 ul H_2O
5) Glykosphingolipidgemisch nach 60 min. Hydrolyse mit 100 ul 1M HCl, MeOH + 400 ul H_2O

HPTLC-Platten 5 x 10 cm (E. Merck)
Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser : conz. Ammoniak (60:35:6:2, v/v)
PPO-Beschichtung; Film: Kodak RP-X-Omat, Belichtung: 72 h bei -80 °C

weise handelt es sich um 4-O-Methyl-N-Acetyl- und 4-O-Methyl-N-Glycolyl-Neuraminsäure, die nicht Neuraminidase labil ist.

In der Fraktion A trat eine Doppelbande auf (Bild 21), die mit dem Lactosylceramid, das durch partielle Hydrolyse gewonnen wurde (Bild), parallel lief. Da bis heute kein völlig Neuraminidase abbaubares Gangliosid bekannt ist, das sich von der Gangliotetraose ableitet, ist zu vermuten, daß es sich bei dieser Doppelbande um ein Lactoneotetraosylceramid handelt.

Die Ursache für das Auftreten der drei weiteren $G_{Lac}1$-Banden (Bild 15-18), sowie der verschiedenen Cerebrosid-Banden (Bild 13,20) wurde durch eine Heterogenität der Ceramidteile erklärt, wodurch eine eingehende Untersuchung der unterschiedlichen Ceramidteile notwendig wurde.

Verteilung der Radioaktivität in den ^{3}H-Gangliosiden $G_{Lac}1$ der Proben 1, 3, 4 und 5

In den Gangliosiden $G_{Lac}1$ der Proben 4 und 3 und den Proben 1 und 5 ist jeweils etwa gleich viel Radioaktivität zu messen (Tabelle VIII). Die Proben 4 und 5 weisen jedoch 50 % weniger Radioaktivität als die Proben 1 und 3 auf. Zusätzlich gibt die Tabelle VIII die Radioaktivität in den einzelnen $G_{Lac}1$-Banden an. Mit den Trennbedingungen, die für diesen Versuch gewählt wurden, konnten die in den Bildern sichtbaren vier $G_{Lac}1$-Banden in fünf $G_{Lac}1$-Banden differenziert werden (Bild 22).
Danach nimmt bei allen Proben die Radioaktivität von der 1. zur 4. Bande hin ab und erreicht in der 5. Bande ein Maximum.

Die Tabelle IX zeigt, daß der prozentuale Anteil der Radioaktivität in den Fettsäuren bei allen Proben von der 1. $G_{Lac}1$-Bande mit 51,6 % $\pm$ 1,9 % zur 5. Bande hin mit 83,6 % $\pm$ 0,6 % zunimmt.

Tabelle: VIII Verteilung der Radioaktivität in den ^{3}H-G_{Lac}^{1}-Gangliosiden der Proben 1, 3, 4 und 5

Probe:	1	3	4	5
		CPM pro G_{Lac}^{1}		
Banden:				
1	173500	283000	249500	272000
2	95500	224000	174000	76500
3	76000	162500	188000	93500
4	151000	245300	157500	76000
5	275000	313500	360250	281000
Summe:	771000	1177500	1136250	799000
		CPM in den Fettsäuren		
1	110000	147000	123500	145500
2	48000	149500	91000	36500
3	44500	103000	141500	54500
4	117500	202500	108000	49000
5	210000	257500	304500	236500
Summe:	490000	859500	768500	522000
		CPM im Sphingosin		
1	60500	118500	102500	95000
2	34700	48500	54000	32000
3	21600	50000	32000	24000
4	24600	48500	50000	25000
5	59700	48000	56000	42000
Summe:	201100	313500	294500	218000

Tabelle: IX Prozentuale Verteilung (*) der Radioaktivität in den $G_{Lac}1$ Gangliosiden der Proben 1, 3, 4 und 5

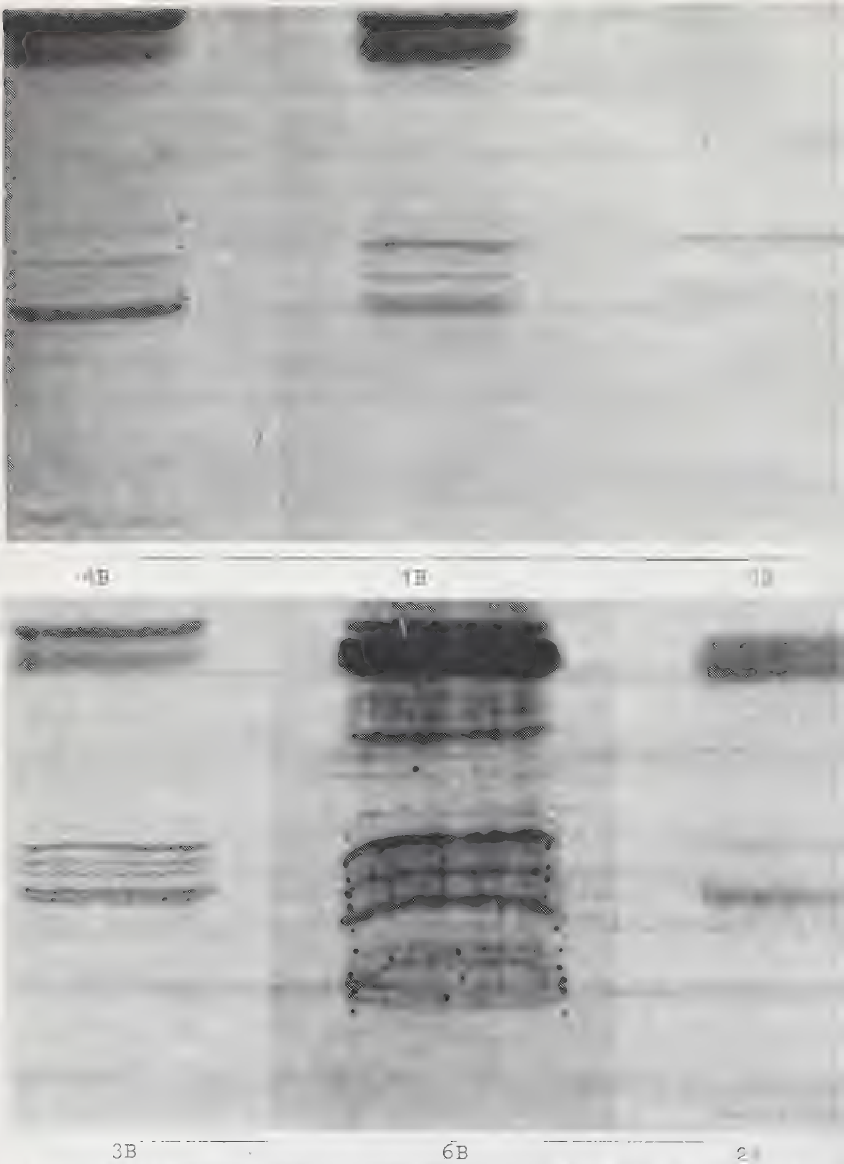
Proben	1 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)
$G_{Lac}1$:	100	100	100	100
Fettsäuren:	67,7	70,0	67,7	65,3
Sphingosin:	25,9	25,5	25,5	27,3
unspezifische cpm:	6,4	4,5	8,8	7,4

Tabelle: X Prozentuale Verteilung (*) der Radioaktivität im Sphingosin- und Fettsäureteil der $G_{Lac}1$-Ganglioside

Probe:	4		3	
Bande:	Fettsäuren (%)	Sphingosin (%)	Fettsäuren (%)	Sphingosin (%)
1	49,5	41,9	51,9	41,8
2	52,3	31,0	66,7	21,7
3	75,3	17,0	63,4	30,8
4	68,6	31,7	82,5	19,7
5	84,5	15,5	82,1	15,3

Probe:	1		5	
Bande:	Fettsäuren (%)	Sphingosin (%)	Fettsäuren (%)	Sphingosin (%)
1	63,4	34,8	53,4	34,8
2	50,3	36,3	47,7	42,1
3	58,6	28,4	58,6	25,8
4	77,3	16,3	64,8	32,9
5	76,4	21,7	84,4	14,9

(*) Die Differenz der Prozente (cpm) von Fettsäuren plus Sphingosin zu 100 % ergibt sich aus der Tatsache, daß entweder bei der Hydrolyse Fettsäuren oder Sphingosin zerstört werden, daß Radioaktivität im Kohlenhydratteil lokalisiert ist, oder daß die Fettsäuren nicht vollständig extrahiert werden und dann nach der Verseifung in die wässrige Phase gelangen.



[illegible]

der Proben 1 - 6

HPTLC-Platten (E. Merck), 5 x 10 cm
Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (60:35:8, v/v)
+ 100 mg KCl pro 100 ml Solvent
Autoradiographie; Film: Kodak RP-X-Omat, belichtet 84 h, 20 °C

Parallel dazu verringert sich der prozentuale Anteil der Radioaktivität im Sphingosin von 35 % - 41 % in der 1. Bande auf 15,2 % ± 0,3 % in der 5. $G_{Lac}1$-Bande.

Die Messung der Radioaktivität der einzelnen $G_{Lac}1$-Banden zeigt, daß die Relation von ungesättigten Fettsäuren zu Sphingosin bei den Gesamt-$G_{Lac}1$-Gangliosiden in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Nährstoffversorgung der Därme (Probe 1, 3, 4, 5) unverändert bleibt.

Im Gegensatz dazu ändert sich aber das Verhältnis von ungesättigten Fettsäuren zu Sphingosin in den einzelnen $G_{Lac}1$-Banden.

So ändert sich das Verhältnis von ungesättigten Fettsäuren zu Sphingosin bei den $G_{Lac}1$-Gangliosiden des Diätdarms (Probe 4) und des Darms, der nach einer Hungerperiode wieder auf Normalkost umgestellt wurde (Probe 3) von der am schnellsten zu der am langsamsten wandernden Bande von 5 : 4 auf 9 : 2. Bei den $G_{Lac}1$-Gangliosiden des Normal- und Hungerdarms (Probe 1 und Probe 5) verschiebt sich dieses Verhältnis von 6 : 3 auf 8 : 2.

Aus diesen Messungen ergibt sich, daß bei den $G_{Lac}1$-Gangliosiden der Proben 4 und 3 im Vergleich mit den Proben 1 und 5 eine Veränderung der Verknüpfung von Fettsäuren und Sphingoidbasen stattgefunden hatte, woraus eine Änderung der Ceramidteile in den einzelnen Gangliosid-Banden resultierte.

In diesen Proben wurde ein relativ größerer Anteil des Sphingosins mit relativ weniger ungesättigten Fettsäuren in den unpolareren Ceramidteilen der am schnellsten wandernden Bande verknüpft und dementsprechend dann ein relativ größerer Teil der ungesättigten Fettsäuren mit relativ weniger Sphingosin in den polareren Ceramidteilen der am langsamsten wandernden $G_{Lac}1$-Banden aufgefunden.

Bestimmung des Gesamtgehaltes an Gangliosid $G_{Lac}1$ in den Proben 1 - 6 mittels des internen Standard

Die Ergebnisse sind in Tabelle XI zusammengefaßt (4.2.3.). Danach liegt die Konzentration von $G_{Lac}1$ im Jejunum der normalernährten Ratte bei 511 ug pro 100 mg Trockengewicht Darm, die sich im Hungerzustand auf 232 ug und nach der proteinreichen, kohlenhydratarmen Diät auf 367 ug reduziert. Wird die Ratte nach einer Hungerperiode (60 h) wieder auf Normalkost umgestellt, so steigt die $G_{Lac}1$-Konzentration mit 527 ug pro 100 mg Trockengewicht fast wieder auf den Normalwert an.

Quantitative Bestimmung und Charakterisierung der Gangliosidkomponenten mittels gaschromatographischer Verfahren:

Gaschromatographische Zuckeranalysen

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der Zukkerkomponenten der $G_{Lac}1$-Ganglioside sind in Tabelle XII dargestellt (4.2.4.).

Daraus geht hervor, daß der Kohlenhydratteil Glucose, Galaktose und Neuraminsäure im Verhältnis von 1 : 1 : 1 enthält. Die Neuraminsäure liegt als N-Acetyl- bzw. als N-Glycolyl-Neuraminsäure vor.

Andere Hexosen wie Fucose, oder N-Acetyl-Glucosamin sowie N-Acetyl-Galaktosamin sind nicht nachweisbar.

Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren und Sphingoidbasen der vier $G_{Lac}1$-Banden

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analysen der Fettsäuren und Sphingoidbasen der Ganglioside der vier $G_{Lac}1$-Banden sind in Tabelle XIII dargestellt (4.2.3.). Von der 1. zur 4. Bande des $G_{Lac}1$ nimmt der Anteil der Hexadecansäure von 29,8 % auf 10,2 % ab.

Tabelle: XI Semiquantitative Bestimmung der Ganglioside über die radioaktive Markierung des Sphingosinteils von $G_{Lac}1$ und des internen Standards

Probe	Sphingosin Probe cpm	Sphingosin Standard cpm	Sphingosin Probe ug	$G_{Lac}1$ pro 100 mg Trockengewicht Jejunum in ug
1	218000	305800	8,9	511
3	314000	333700	12,4	527
4	294500	338000	10,8	367
5	201100	327400	7,7	232

Tabelle: XII Gaschromatographische Analyse der Zuckerbestandteile der $G_{Lac}1$ Ganglioside der Probe 1

Die Zuckerbestandteile verhalten sich zueinander wie:

Fucose	Galaktose	Glucose	N-acetyl Galaktosamin	N-acetyl Glucosamin
-	1,1	0,96	-	-

Neuraminsäure	N-acetyl Neuraminsäure	N-glycolyl Neuraminsäure
0,4	0,6	0,3

Ebenso verringert sich der Prozentanteil der Octadecansäure von 8,8 % auf 2,9 %

Der Anteil der Docosansäure bleibt in den 4 Banden des $G_{Lac}1$ mit 19 % $\pm$ 2 % annähernd konstant.

Dagegen wird ein Ansteigen der Fettsäuren mit 24 Kohlenstoffatomen von der 1. zur 4. Bande hin beobachtet.

In der 1. Bande beträgt die Tetracosansäure 15,3 % und steigt auf 26,9 % in der 2. Bande an.

Addiert man in der 3. und 4. Bande den Anteil der Tetracosansäure mit der hier erstmals auftretenden 2-Hydroxy-Tetracosansäure, so nimmt der Gesamtanteil der C_{24}-Fettsäuren von der 3. zur 4. Bande von 24,4 % auf 38,1 % zu.

Ebenso kann in der 3. Bande erstmals die 2-Hydroxy-Eicosansäure und die 2-Hydroxy-Hexadecansäure mit 5,9 % bzw. 3,8 % nachgewiesen werden. Ihre prozentualen Anteile nehmen im Vergleich zur 4. Bande mit 5,9 % bzw. 2,6 % geringfügig ab.

Abgesehen von den 0,9 % der 2-Hydroxy-Hexadecansäure, die in der 1. Bande auftreten, treten in den beiden oberen Banden (1. und 2.) keine Hydroxy-Fettsäuren auf.

In dem prozentualen Verhältnis der einzelnen Aminoalkohole zueinander sind ebenfalls innerhalb der 4 Banden des $G_{Lac}1$ deutliche Verschiebungen festzustellen.

Von der 1. zur 4. Bande nimmt der Gesamtanteil von C_{18}-Sphingosin und Sphinganin von 90,6 % auf 29,3 % deutlich ab.

Der Gesamtanteil der ungesättigten Fettsäuren der 4 Banden liegt bei 11 % $\pm$ 1,6 %.

Tabelle: XIII Analyse der Fettsäuren und Aminoalkohole des Gangliosid $G_{Lac}1$ des Normaldarms (Probe

(Die Ergebnisse sind in Gewichtsprozent angegeben.)

Fettsäuren	1. Bande (%)	2. Bande (%)	3. Bande (%)	4. Bande (%)
16	29,8	26,2	17,6	10,2
16 (OH)	0,9	-	3,8	2,6
18:1	2,4	4,4	-	1,5
18	8,8	10,5	3,0	2,9
20	15,5	5,2	17,4	12,7
22	22,1	16,6	16,5	18,9
22 (OH)	-	-	6,4	5,4
24:1	7,0	8,2	5,9	6,0
24	15,3	26,9	11,4	16,5
24:1 (OH)	-	-	3,9	2,8
24 (OH)	-	-	15,0	21,6
Aminoalkohole:				
Sphingosin Sphinganin	90,6	80,4	58,6	29,3
4D-Hydroxy-sphinganin	9,4	19,6	41,4	70,7

Fettsäurenanalyse der G_{Lac}^1-Ganglioside der Proben 1 - 6

Tabelle XV zeigt die Änderung der Fettsäuremuster der Gesamt-G_{Lac}^1-Ganglioside in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Nährstoffversorgung des Rattenjejunums (4.2.3.).

Aus Tabelle XIV gehen die prozentualen Verschiebungen innerhalb des Fettsäuremusters des G_{Lac}^1 in Abhängigkeit der unterschiedlichen Ernährungszustände des Darms hervor. Diese Veränderungen werden am deutlichsten sichtbar, wenn die Gesamtanteile der gesättigten, ungesättigten und Hydroxy-Fettsäuren miteinander verglichen werden.

Im G_{Lac}^1 des Normaldarms liegen die gesättigten Fettsäuren zu den ungesättigten und Hydroxy-Fettsäuren im Verhältnis von 3 : 3 : 1 vor. Werden den Tieren die Nährstoffe entzogen (Probe 5), so werden die gesättigten und die ungesättigten Fettsäuren jeweils um 50 % und die Hydroxy-Fettsäuren um 30 % vermindert.

Tabelle: XIV Prozentuale Verteilung der gesättigten, ungesättigten und Hydroxy-Fettsäuren des G_{Lac}^1 der Proben 1-6

Probe:	1	2	3	4	5	6
ges. FS (%)	45,0	25,9	60,0	38,8	36,3	31,1
unges. FS (%)	14,9	19,8	10,4	13,4	14,4	33,3
Hydroxy-FS (%)	45,9	59,4	31,3	53,8	59,0	35,6

Im Ganzen gesehen ergibt sich eine Abnahme der Fettsäuren und damit auch des Gangliosids G_{Lac}^1 um die Hälfte.

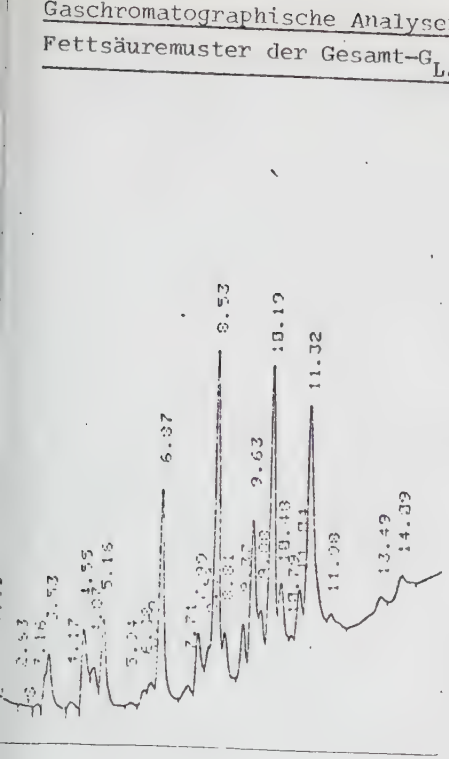
Werden die Tiere wieder normal ernährt (Probe 3), so erhöht sich die Gesamtfettsäuremenge wieder auf das ursprüngliche Niveau (Tab. XVII). Dies wird dadurch erreicht, in-

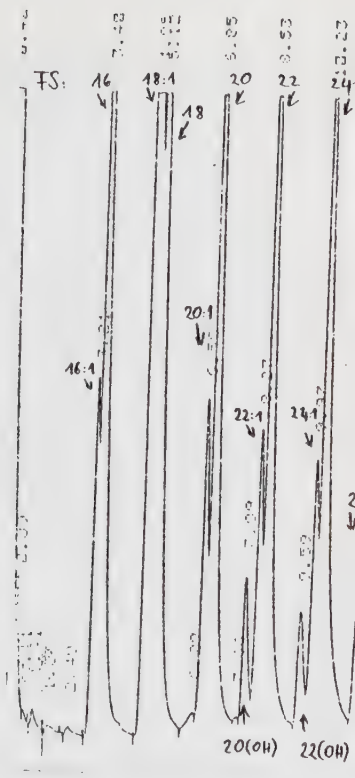
Tabelle: XV Fettsäureanalyse der $G_{Lac}1$ Ganglioside der Proben 1 - 6

Fettsäuren	Proben: 4 (%)	2 (%)	3 (%)	1 (%)	5 (%)	6 (%)
16	3,0	4,2	3,9	2,6	2,9	6,4
16 (OH)	3,3	1,4	2,3	3,1	2,5	0,3
18:1	1,8	7,1	1,4	1,7	1,8	9,9
18	3,0	5,4	4,7	3,4	4,2	3,8
18 (OH)	1,5	-	0,4	0,8	1,2	-
20:1	0,8	2,2	0,6	1,0	1,5	-
20	10,0	2,8	15,4	8,8	6,2	6,4
20 (OH)	8,6	5,6	2,4	3,7	6,7	-
22:1	1,6	5,3	1,3	2,2	4,1	6,0
22	11,5	5,6	19,4	14,4	9,8	7,3
22 (OH)	13,8	24,0	5,5	9,6	20,7	-
24:1	3,6	-	3,5	4,2	-	16,3
24	11,2	7,9	16,6	15,7	13,1	8,0
24:1 (OH)	5,8	5,2	3,6	6,8	7,0	2,6
24 (OH)	20,7	23,2	17,1	22,0	20,9	33,1

Fig.: 8

Gaschromatographische Analysen der Fettsäuremuster der Gesamt-G_{Lac}^{1-}





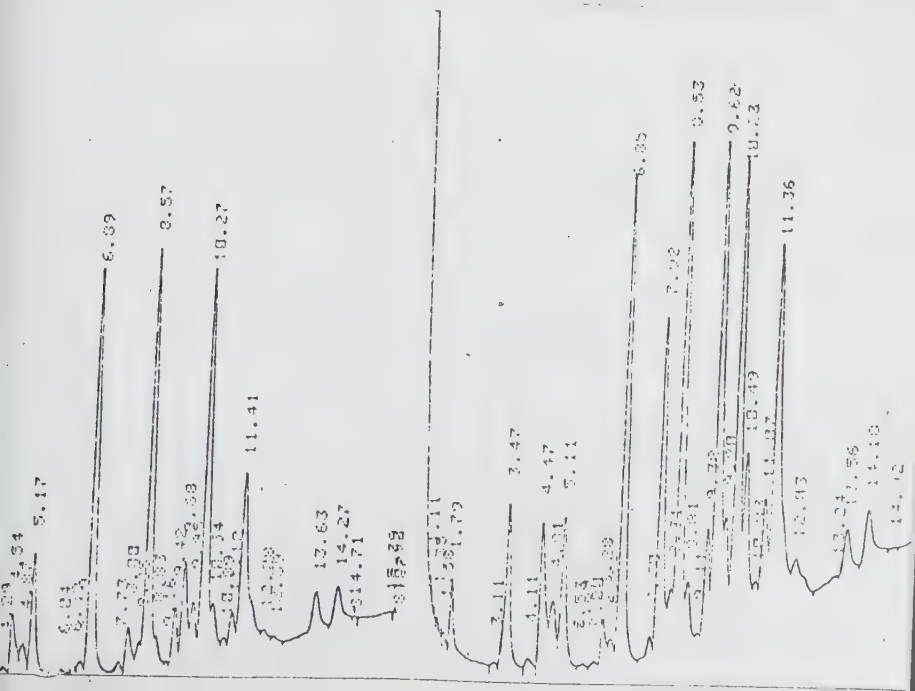
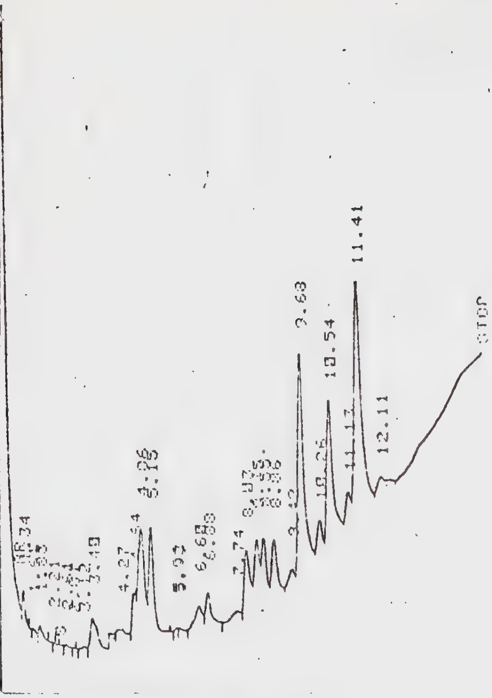
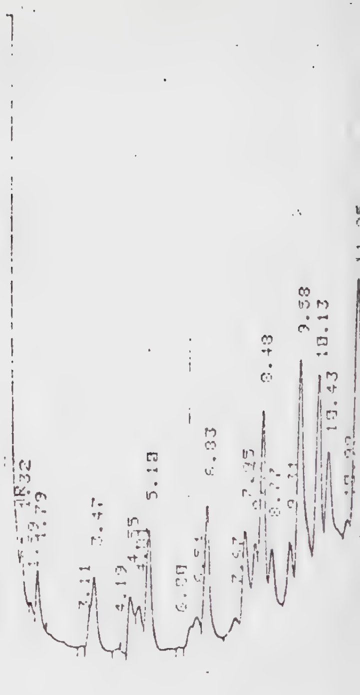


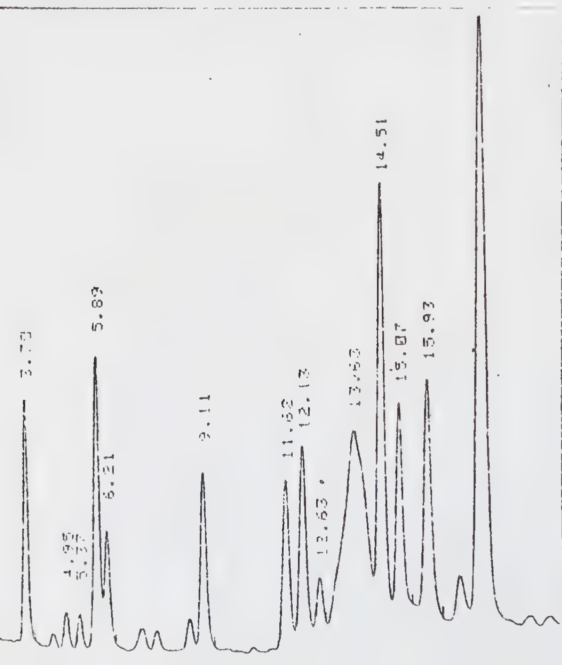
Fig.: 8

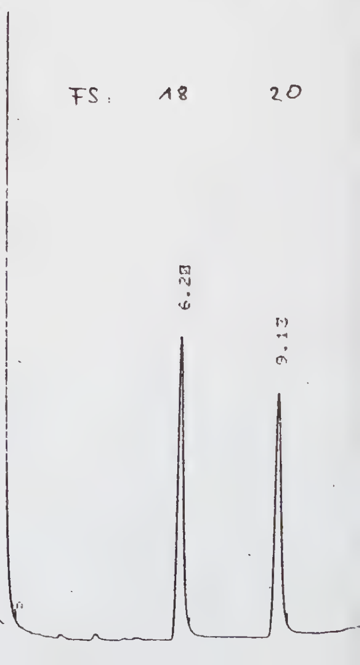


2B



4B





dem die gesättigten Fettsäuren vierfach, die ungesättigten Fettsäuren doppelt und die Hydroxy-Fettsäuren um 30 % erhöht auftreten.

Werden die Tiere vom Normalfutter auf die proteinreiche Diät (Probe 4) umgestellt, so vermindert sich die Gesamtmenge der Fettsäuren um ein Viertel und die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren werden um 30 % abgebaut. Die Konzentration der Hydroxy-Fettsäuren bleibt dagegen konstant.

Wird den Tieren auch noch die proteinreiche Diät entzogen (Probe 2), so verringern sich die Gesamtfettsäuren nochmals um zwei Drittel, wobei die gesättigten Fettsäuren am stärksten mit 60 % abgebaut werden. Die ungesättigten Fettsäuren werden um 10 % und die Hydroxy-Fettsäuren um 30 % vermindert.

Wird dagegen den Tieren nach der proteinreichen Diät die Normalkost wieder gegeben, so nimmt die Gesamtmenge der Fettsäuren um 10 % zu und es werden die ungesättigten Fettsäuren verdreifacht. Die gesättigten und die Hydroxy-Fettsäuren werden jedoch nochmals um 10 % bzw. 25 % verringert.

Die Fettsäureanalyse der Phospholipide zeigt, daß bei den Diättieren und Hungertieren die Phospholipidkonzentration im Vergleich zu den normal ernährten Tieren um 25 % bzw. um 60 % abnimmt. Nach der Umstellung der Hungertiere wieder auf Normalkost steigt die Phospholipidkonzentration wieder an.

Die Fettsäureanalyse gibt außerdem Aufschluß über die Zusammensetzungsverhältnisse der ungesättigten zu den gesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden.

Bei den normal ernährten Tieren ist ein Verhältnis von 0,6 : 1 festzustellen. Bei den Diättieren steigt der Anteil der ungesättigten Fettsäuren auf 0,7 : 1 an und es sind 7 % Hydroxy-Fettsäuren nachweisbar. Bei den Hungertieren geht der Anteil der ungesättigten Fettsäuren auf 0,3 : 1, also um die Hälfte gegenüber der Probe 1 zurück.

Tabelle: XVI Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide des Rattenjejunums in Abhängigkeit der unterschiedlichen Ernährungszustände der Tiere

1) Gehalt der Gesamtfettsäuren der Phospholipide in mg pro 100 mg Jejunum Trockengewicht:

Probe:	1	3	4	5
	8,2	6,6	6,5	3,1

2) Anteil der einzelnen Fettsäuren an den Gesamt-Fettsäuren der Phospholipide in %:

Probe:	1	3	4	5
Fettsäuren:				
16:1	n.n.	n.n.	3	n.n.
16:0	27,4	25,1	16,3	26,1
18:1	36,3	29,4	35,2	21,1
18:0	36,3	45,5	38,3	51,8
18 (OH)	n.n.	n.n.	7,2	n.n.

3) Verhältnis der ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren:

Probe:	1	3	4	5
ungesättigte Fettsäuren	0,6	0,4	0,7	0,3
gesättigte Fettsäuren	1	1	1	1

Die Tiere, die nach der Hungerperiode wieder auf Normalkost umgestellt wurden (Probe 3) weisen in ihren Phospholipiden wieder einen Anstieg der ungesättigten Fettsäuren auf.

Bestimmung der Gesamt-$G_{Lac}1$-Ganglioside der Proben 1-6 durch quantitative Auswertung der gaschromatographischen Fettsäureanalysen

Fettsäureanalysen der oben beschriebenen $G_{Lac}1$-Ganglioside der Proben 1-6 wurden quantitativ mit Hilfe eines Fettsäurestandards ausgewertet und auf µg $G_{Lac}1$ pro 100 mg Jejunum Trockengewicht umgerechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle XVII zusammengefaßt.

Danach liegt der Gehalt von $G_{Lac}1$ des Normaldarms bei 557 µg pro 100 mg Jejunum Trockengewicht.

Im Hungerzustand wird er um ca. ein Drittel auf 364 µg pro 100 mg Trockengewicht reduziert. Wird der Darm mit der isoenergetischen kohlenhydratarmen und proteinreichen Diät ernährt, so nimmt der $G_{Lac}1$-Gehalt auf 378 µg pro 100 mg Trockengewicht ab und sinkt nach darauffolgendem Futterentzug weiter auf 227 µg $G_{Lac}1$ pro 100 mg Trockengewicht ab.

Werden die Ratten nach der Diätfütterung auf Normalkost umgestellt, so steigt der $G_{Lac}1$-Gehalt wieder auf 424 µg und ebenso nimmt der $G_{Lac}1$-Gehalt nach einer Hungerperiode und anschließender Fütterung mit Normalkost auf 592 µg pro 100 mg Jejunum Trockengewicht zu.

Tabelle: XVII Konzentrationsbestimmung der Ganglioside $G_{Lac}1$ der Proben 1 - 6 mittels der gaschromatographischen Analyse ihrer Fettsäuren

Probe	Integral als Konzentrationseinheiten der Fettsäuren	Mittels des Fettsäurestandards in µg Fettsäuren umgerechnet	$G_{Lac}1$ pro 100 mg Trockengewicht Jejunum in µg
1	$5,4 \cdot 10^6$	27,5	557
2	$1,9 \cdot 10^6$	9,6	227
3	$10,2 \cdot 10^6$	51,9	592
4	$8,2 \cdot 10^6$	42,0	378
5	$7,6 \cdot 10^6$	38,7	364
6	$13,6 \cdot 10^6$	69,2	424

(Fettsäurestandard: 11,1 µg = $1,28 \cdot 10^6$ Integraleinheiten!)

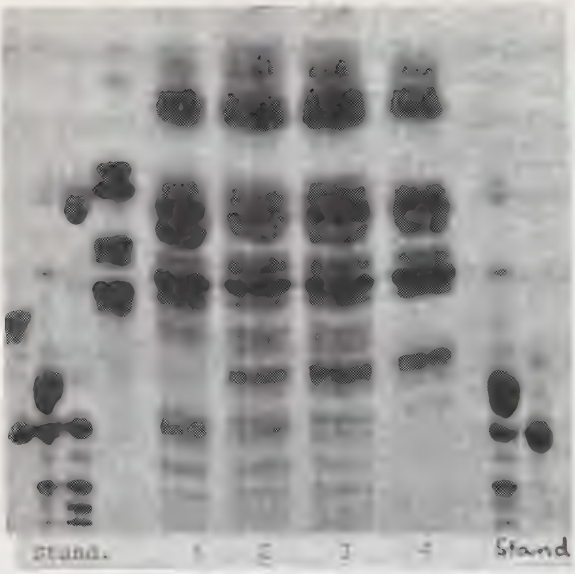
3.2.2. Änderung der Glykosphingolipid-Zusammensetzung des Kaninchendarms nach Enterotoxin-Inkubation

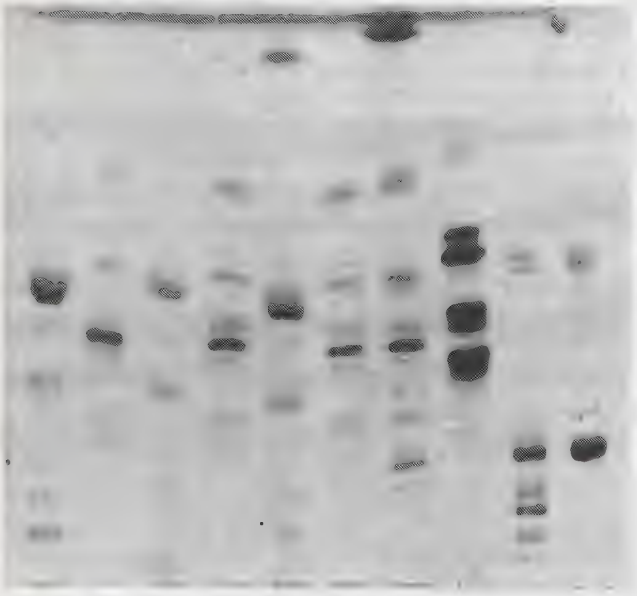
Die Bilder Nr. 23 und Nr. 24 zeigen die Veränderung der Glykosphingolipide des Kaninchendarms nach Inkubation mit Escherichia Coli- und Cholera-Toxin im Vergleich mit dem Kontrolldarm, sowie die Glykosphingolipide des nach Choleratoxinbehandlung abgestoßenen Darmepithels (4.5.).

Aus den Bildern geht hervor, daß nach der Toxinbehandlung eine Doppelbande eines zusätzlichen neutralen Glykosphingolipids mit 6 Zuckerkomponenten im Kohlenhydratteil im Kaninchendarm nachweisbar ist.

Parallel dazu ist eine Abnahme eines 7 Zucker enthaltenden neutralen Glykosphingolipids in beiden toxinbehandelten Därmen zu beobachten.

Darüberhinaus zeigt der Vergleich der Gesamt-Glykosphingolipide des mit Choleratoxin behandelten Darms und der Glykosphingolipide der nach Choleratoxinbehandlung abgestoßenen Mukosazellschicht, daß bis auf drei Glykosphingolipide, die in sehr geringer Konzentration auftreten und die bei der dünnschichtchromatographischen Trennung langsamer als der $G_{Gtet}1$-Standard wandern, alle Glykosphingolipide, die in dem Gesamtdarm gefunden werden, auch in der abgestoßenen Darmepithelschicht nachgewiesen werden können.





Einfluß von Enterotoxinen auf die Glykosphingolipide des Kaninchendarms

1 = Kontrolle; 2 = nach E. coli-Toxin-Inkubation;
3 = nach Cholera-Toxin-Inkubation;
4 = abgestoßenes Darmepithel nach Cholera-Toxin-Inkubation;
5, 6, 7 = Standardglykosphingolipide;
a = neutrale und b = [illegible] golipide

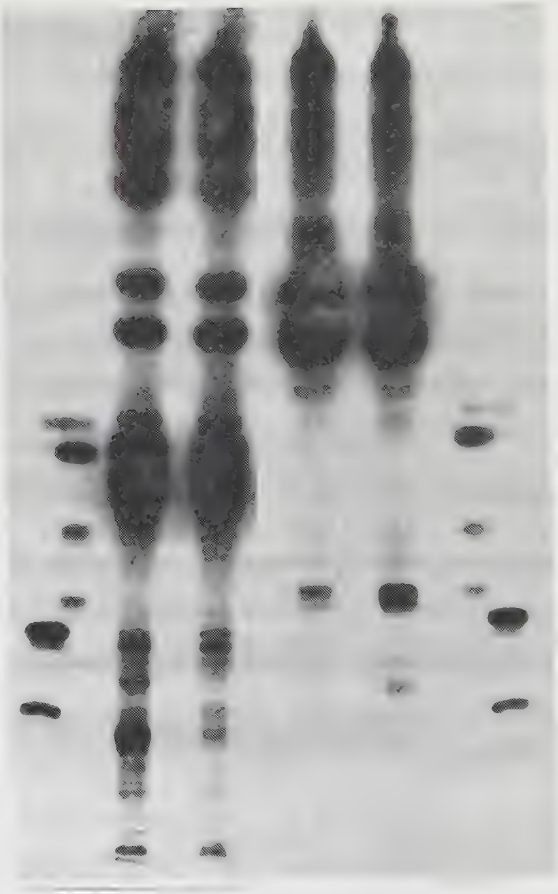
3.2.3. Änderung der Hirn-Glykosphingolipide von Göttinger Minischweinen nach pharmakologischer Behandlung mit Chlorochin

Das Bild Nr. 25 zeigt die neutralen und sauren ^{3}H-Glykosphingolipide von Spinalganglien eines Göttinger Minischweines nach Chlorochinbehandlung durch Dr. Klinghardt (51) im Vergleich mit den Glykosphingolipiden adequaten Hirnmaterials eines Kontrolltieres (4.4.).

Dabei kann ein deutlicher Unterschied in der Konzentration des Globosids und eines Gangliosids, das langsamer als der G_{Gtet}^{1}-Standard läuft, gezeigt werden.

Die Messung der Radioaktivität des Globosids ergibt bei dem Versuchstier eine Steigerung der Radioaktivität um das 8 Fache, während bei dem Gangliosid eine Zunahme der Radioaktivität um das 19 Fache im Vergleich mit dem Kontrolltier zu verzeichnen ist.

Damit werden die Ergebnisse von Sandhoff (52), der eine Zunahme dieses Gangliosids nach doppelt so langer Chlorochinbehandlung um das 25 Fache und von Svennerholm (53), der ebenfalls eine wesentlich höhere Konzentration dieses Gangliosids im Gesamthirn des Minischweins fand, bestätigt.



1 2 3 4 5 6 7

Ganglioside-
Sulfatid-
Fraktion

Neutrale
Glykosphingolipid-
Fraktion

Einfluß von Chlorochin auf Spinalganglien Glykosphingo-

1, 6 und 7 = Standard-Glykosphingolipide
2 = mit Chlorochin; 5 = mit Chlorochin
Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser : conz. Ammonia
(60:35:6:2, v/v)
Kieselgel 60-Fertigplatten
PPO-Beschichtung; Kodak RP-X-Omat, -78 °C, 36 h

3.2.4. Untersuchung der Glykosphingolipid-Zusammensetzung peripherer Humanlymphozytenpopulationen

Das Bild Nr. 26 zeigt die neutralen ^{3}H-Glykosphingolipide von peripheren Humanlymphozyten, die von Dr. Seiler (Behringwerke AG) mittels der trägerfreien Elektrophorese in drei Fraktionen getrennt wurden.

Im Vergleich mit diesen Lymphozyten wurden Humanlymphozyten, die in Zellkultur gehalten wurden, untersucht und co-chromatographiert.

Wie Bild Nr. 26 zeigt, weisen die neutralen Glykosphingolipide der einzelnen Fraktionen starke qualitative und quantitative Unterschiede auf.

In der ersten Fraktion erscheint die langsamer wandernde Bande des Monohexosylceramids wesentlich stärker ausgeprägt als bei den anderen beiden Fraktionen.

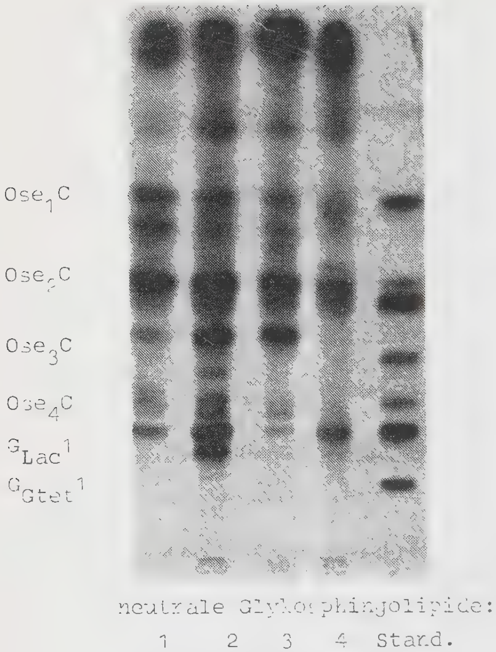
In der 2. und 3. Fraktion erscheint hingegen zusätzlich zur Doppelbande des Dihexosylceramids ein weiteres Cerebrosid, das zwischen dem Di- und Trihexosylceramid wandert und das in der 1. Fraktion in wesentlich geringerer Konzentration vorhanden ist.

In der 2. Fraktion erscheint die Doppelbande eines neutralen Glykosphingolipids, das in der 1. und 3. Fraktion fast völlig fehlt. Dieses Glykosphingolipid läuft im Dünnschichtchromatogramm unterhalb des Globosids und etwa in der Höhe des G_{Lac}^{1}-Standards.

Aus dem Wanderungsverhalten im Dünnschichtchromatogramm ist zu entnehmen, daß es sich bei der Substanz um ein neutrales Glykosphingolipid mit 5 Zuckeranteilen handelt.

Im Vergleich mit den in Zellkultur gehaltenen Lymphozyten, weisen die aus Humanserum gewonnenen Lymphozyten eine größere Anzahl verschiedener Glykosphingolipide auf.

[illegible]



Glykosphingolipide peripherer Humanlymphozytenpopulationen

1 = Fraktion 1
2 = " 2
3 = " 3
4 = Kulturlymphozyten (Humanly.)

Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser (60:35:8, v/v)
+ 20 mg KCl pro 100 ml Solvent

PPO-Beschichtung; Film: Kodak RP-X-Omat, Belichtung: -70 °C, 36 h

3.3. Diskussion

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse der Steigerung aktiver Transporte für D-Glucose und L-Leucin durch die Mukosazellen des Rattendarms nach Futterentzug und Ernährung mit einer proteinreichen und kohlenhydratarmen Diät im Vergleich mit normalernährten Tieren stehen mit den in der Literatur publizierten Resultaten vollständig in Einklang (41-48).

Bei beiden Ernährungssituationen, im Zustand des Hungers und nach Versorgung der Ratten mit proteinreicher und kohlenhydratarmer Diät, werden dem Rattendarm keine verwertbaren Kohlenhydrate angeboten, womit eine drastische Erhöhung der Transporte für D-Glucose und L-Leucin zu beobachten ist.
Im Gegensatz dazu läßt sich ein gemeinsames Resorptionsverhalten bei den normal- und diäternährten Ratten, die ausreichend mit allen Nährstoffen versorgt wurden, nicht feststellen.
Wurden die Hungertiere wieder auf Normalkost umgestellt, die einen hohen Anteil verwertbarer Kohlenhydrate enthielt, so reduzierten sich die Resorptionsraten für beide Nährstoffe wieder auf die Normalwerte.

Auf Grund dieser Befunde läßt sich vermuten, daß die Resorption von unterschiedlich aktiv transportierten Nährstoffen, wie Aminosäuren und Glucose, über einen gemeinsamen glucoseabhängigen Rückkopplungsmechanismus reguliert werden.

Reiser wies schon 1969 darauf hin, daß eine gemeinsame energieabhängige Steuerung der aktiven Transporte sein müsse (54), wodurch ihre gegenseitige Hemmung bei der aktiven Aufnahme in die Mukosazellen erklärt werden könnte.

Durch die Arbeiten von Whright und Barber (55) ist wahrscheinlich gemacht worden, daß die Energie für die aktiven Transporte von Nährstoffen im Darm wesentlich durch die ß-Oxidation der Fettsäuren geliefert wird. Die Abnahme der Membranlipide wie $G_{Lac}1$ und sehr wahrscheinlich auch der

übrigen Glykosphingolipide, sowie der Phospholipide, könnte daher durch eine verstärkte ß-Oxidation der Fettsäuren im Hungerzustand und nach kohlenhydratarmer und proteinreicher Ernährung erklärt werden.

In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Grolner und van Golde (56) sehr interessant, die Veränderungen von Phospholipiden in der Leber von Ratten nach Futterentzug und anschließender Wiederauffütterung mit saccharosereicher Normalkost feststellten.
Sie konnten zeigen, daß im Hungerzustand die Phospholipide um 40 % bezogen auf Gesamtprotein der Leber abnahmen und nach Wiederauffütterung den Normalgehalt wieder erreichten.

Möglicherweise lassen sich ebenfalls durch eine verstärkte ß-Oxidation der Fettsäuren die Veränderungen der Glykosphingolipid-Muster im Hunger und nach Diätfütterung verstehen, die eine Zunahme der polaren Glykosphingolipid-Komponenten von Mono- und Trihexosylceramid, sowie von $G_{Lac}1$ aufweisen. Diese polaren Glykosphingolipid-Komponenten konzentrieren sich bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung in den am langsamsten wandernden Banden dieser Glykosphingolipide.
Wie die gaschromatographischen Analysen zeigen, weisen die unpolaren $G_{Lac}1$-Komponenten einen sehr hohen Gehalt an Hydroxy-Fettsäuren und an 4D-Hydroxysphinganin im Ceramidteil auf.

Darüberhinaus läßt sich ein erhöhtes Auftreten von Hydroxy-Fettsäuren in den Glykosphingolipiden des Hunger- und Diätdarmes durch eine verstärkte ß-Oxidation der Fettsäuren in den Mukosazellen erklären, bei der die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren schneller als die Hydroxy-Fettsäuren abgebaut werden. Dadurch werden die Hydroxy-Fettsäuren im Fettsäurepool der Zellen angereichert und können dann in verstärktem Maße bei der reduzierten aber noch vorhandenen De-Novosynthese von Glykosphingolipiden in den nach der Darmabschülferung neu herangebildeten Mukosazellen eingebaut werden.

Da nach Wiederauffütterung der Hungertiere mit Normalkost die verstärkte ß-Oxidation der Fettsäuren sehr wahrscheinlich zurückgeht und parallel dazu ebenfalls eine Abnahme der Hydroxy-Fettsäuren bei einem drastisch verstärkten Einbau von gesättigten Fettsäuren in die Glykosphingolipide zu beobachten ist, erscheint die oben dargestellte Erklärungsmöglichkeit für die Lipidveränderungen bei kohlenhydratfreier Ernährung als wahrscheinlich.

Möglicherweise handelt es sich bei den beobachteten Änderungen der Darmlipide nicht nur um den Ausdruck einer Stoffwechselnotsituation, sondern darüberhinaus ebenfalls um eine Änderung der physiko-chemischen Eigenschaften der Membranen der Mukosazellen, die durch Aktivierung der Carrierproteine zu einer Steigerung der aktiven Transporte führt.
Es ist nämlich bekannt, daß die Enzymaktivität bestimmter membranständiger Enzyme in Abhängigkeit von der Änderung der Fluidität der Membran gesteigert werden kann (57-59).

Möglicherweise bewirkt gerade das zusätzliche Auftreten von Hydroxylgruppen im Ceramidteil, der in der unpolaren Lipiddoppelmembranschicht lokalisiert ist, eine solche Veränderung des hydrophoben Teils der Membran, wodurch eine stärkere Wechselwirkung mit Membranproteinen zustande kommt.

Eine Beeinflussung von membranständigen Enzymen durch Glykosphingolipide erscheint nach den Untersuchungen von Sharon et.al. (60), die starke Interaktionen zwischen Gangliosiden und Glykoproteinen messen konnten, als durchaus denkbar. Es sollte daher auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß Veränderungen der Glykosphingolipide Änderungen von Enzymen oder Transportsystemen in der Membran der Mukosazellen bewirken können.

Gegenwärtig existieren aber noch zu wenige Hinweise über ein Zusammenwirken von Lipiden und Proteinen bei aktiven Resorptionsvorgängen, als daß die hier beschriebenen Vermutungen mehr als eine Hypothese rechtfertigen könnte.

Die Vermutung liegt jedoch nahe, daß Glykosphingolipide einen Einfluß auf aktive Resorptionsprozesse ausüben oder sogar an ihnen beteiligt sind. Die für aktive Transportprozesse hoch spezialisierten Zellen, wie zum Beispiel die Mukosazellen, enthalten im Vergleich zu anderen Zellen sehr hohe Glykosphingolipid-Konzentrationen in ihren Zellmembranen.

Können einerseits durch diätetische Maßnahmen als eine Form des experimentellen Eingriffs die Glykosphingolipide des Darms verändert werden, so lassen sich andererseits durch Einwirkung von Enterotoxinen als eine andere Form des experimentellen Eingriffs Veränderungen der Zusammensetzung der Darm-Glykosphingolipide beobachten.

Werden durch die unterschiedliche Nährstoffversorgung des Rattendarms vor allem Änderungen des Ceramidteils festgestellt, so kommt es nach der Toxininkubation des Kaninchendarms zu einer Veränderung des Kohlenhydratteiles der Glykosphingolipide. Dabei tritt nach der Inkubation des Kaninchendarms mit Cholera- und E. Coli-Toxin ein neutrales Glykosphingolipid, das sechs Zuckerkomponenten enthält, verstärkt auf, während ein neutrales Glykosphingolipid mit sieben Zuckerkomponenten im Kohlenhydratteil stark vermindert wird.
Dies könnte bedeuten, daß die Biosynthese des neutralen Glykosphingolipids mit sechs Zuckerkomponenten durch diese Enterotoxine gesteigert wird, oder daß die Biosynthese des höherglykosylierten Glykosphingolipids durch Blockierung der spezifischen Glykosyltransferase gehemmt wird. Dadurch kann ein Konzentrationsanstieg des kürzerkettigen auf Kosten des höherglykosylierten Glykosphingolipids erklärt werden.

Die mögliche Hemmung des für die Verlängerung der Kohlenhydratkette dieses Glykosphingolipids verantwortlichen Enzyms und die dadurch hervorgerufene qualitative Änderung des Glykosphingolipid-Musters kann aber sicherlich nicht als der entscheidende Einfluß dieser Enterotoxine auf die

so drastische Beeinflussung der Darmfunktion, sondern eher als eine Begleiterscheinung interpretiert werden.

In diesem Zusammenhang ist allerdings interessant, daß ebenfalls nach Choleratoxininkubation von Chinees-Hamster-Ovar-Zellen die Anreicherung eines neutralen Glykosphingolipids zu beobachten ist (Schwarzmann, Schlemmer, Sattler, Stärk, Wiegandt).

Ähnliche Veränderungen der Glykosphingolipid-Muster und Speicherungen bestimmter Glykosphingolipide werden bei Lipidspeicherkrankheiten beobachtet.
Dabei liegt entweder ein genetisch bedingter Mangel bestimmter, am Abbau dieser Glykosphingolipide beteiligten Enzyme, oder ein Mangel von Aktivatoren dieser Enzyme vor, wodurch es zu einer Speicherung bestimmter Sphingolipide kommt.
Klinghardt (51) konnte zeigen, daß es nach pharmakologischer Behandlung mit Chlorochin zu einer histologischen Veränderung im Gehirn von Göttinger Minischweinen in der Art einer Speicherdystrophie kommt.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Analysenmethode konnte an wenigen Milligramm Hirnmaterials aus Spinalganglien festgestellt werden, daß es nach Chlorochinbehandlung zu einer drastischen Speicherung eines neutralen Glykosphingolipids und eines Gangliosids kommt (Bild 25).
Damit werden die Ergebnisse von Sandhoff (47) und von Svennerholm (48) bestätigt, die ihre Analysen am Gesamthirn des Minischweins durchführten, während für diese Ergebnisse nur wenige Milligramm Hirnmaterials einer bestimmten Hirnregion erforderlich waren.

Somit erweist sich diese Analysenmethode auch zur Untersuchung von Glykosphingolipiden kleinster Gewebsproben, die u.a. bei Biopsie-Material vorliegen, als erfolgreich anwendbar.
Gerade bei Biopsie-Proben ist eine möglichst empfindliche Methode zur Untersuchung von Glykosphingolipiden erforderlich, wozu sich diese Mikromethode eignet. Da in solchen Fällen eine radioaktive in-vivo-Markierung zur Herabsetzung

der Nachweisgrenze von Glykosphingolipiden nicht zu vertreten ist, stellt die in-vitro-Markierung bei der Analyse der Glykosphingolipide eine vorteilhafte Maßnahme dar. Kennt man die Ursache der zu diagnostizierenden Lipid-Stoffwechselstörung, z.B. deren genetisch bedingte Enzymdefekte, so kann man zu deren Diagnose Untersuchungen mit Patientenblut durchführen. Ist hingegen die Ursache dieser Stoffwechselstörung unbekannt, so wird die Bestimmung der gespeicherten Lipide erforderlich, wozu die in dieser Arbeit entwickelte Mikromethode geeignet ist.

An einem weiteren Beispiel konnte die Empfindlichkeit dieser Mikromethode demonstriert werden. Bei dieser Untersuchung konnten die Glykosphingolipide aus 1 - 2 mg peripherer Humanlymphozyten analysiert werden, und es konnte dabei festgestellt werden, daß die in der trägerfreien Elektrophorese getrennten verschiedenen Lymphozytenpopulationen drastische Unterschiede der neutralen Glykosphingolipide aufwiesen.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Analysenmethode ist eine Möglichkeit gegeben, nicht nur im Mikromolbereich, sondern auch im Nanomolbereich an kleinsten Mengen homogenen Zellmaterials detaillierte Studien über die qualitative und nahezu quantitative Zusammensetzung von Glykosphingolipiden durchführen zu können, um nähere Einblicke über die biologische Bedeutung dieser Membranlipide zu erhalten.

4. Material und Methoden

4.1. Entwicklung der Analysenmethode

4.1.1. Untersuchung der einzelnen Schritte der Analysenmethode

Quantitative Extraktion der Glykosphingolipide aus Gewebe

Den gesamten Ratten-Milzorganen wurde vor der Gefriertrocknung jeweils 25 ul einer Lösung injiziert, die aus gleichen Anteilen tritiummarkiertem $G_{Lac}{}^1$ und Galaktosylceramid bestand.

Nach der Extraktion mit 20 ml Chloroform : Methanol (2:1,v/v), Chloroform : Methanol (1:1, v/v) und 20 ml Chloroform : Methanol (1:2, v/v) wurden die abzentrifugierten Lösungen zur Trockene eingedampft und mit 2 ml Chloroform : Methanol (1:1, v/v) aufgenommen. Ein Aliquot wurde gezählt. Der Versuch wurde mit anderen Extraktionsmitteln wiederholt (20 ml Chloroform : Methanol (10:5, v/v), 20 ml Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v), 20 ml Chloroform:Methanol:Wasser (5:10:2, v/v)). Nach dem Eindampfen der Lösungen und Wiederaufnehmen in 3 ml Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v) wurden ein Aliquot der Gesamtlösung in 10 ml Unisolve im Flüssigkeitsszintillationszähler (LKB Frankfurt) gezählt.

Reinigung der Glykosphingolipide an Florisil

^{3}H-Cholesterinester, peracetyliertes ^{3}H-Galaktosylceramid, peracetyliertes ^{3}H-$G_{Lac}{}^1$ und peracetylierte ^{3}H-Phospholipide aus Rattenmilz[(x)] wurden jeweils getrennt auf eine Florisilsäule[(y)] mit einem Säulenvolumen von 8 ml gegeben

(x) Cholesterin bzw. Phospholipide wurden extrahiert, gereinigt, umkristallisiert und nach G. Schwarzmann (33) markiert. Tritium-markiertes Monohexosylceramid und ^{3}H-$G_{Gtet}{}^1$ wurden von G. Schwarzmann zur Verfügung gestellt.

(y) Das Florisil wurde von der Firma Roth, Heidelberg bezogen.

und mit 40 ml 1,2-Dichloräthan (DCE) : Hexan (1:1, v/v), mit 100 ml DCE, mit 100 ml DCE : Aceton (1:1, v/v) und 100 ml DCE : Methanol : Wasser (20:80:20, v/v) eluiert(x). Die 1. Säule wurde mit ^{3}H-Cholesterinester(y), die 2. Säule mit peracetyliertem ^{3}H-Galaktosylceramid(y), die 3. Säule mit peracetyliertem ^{3}H-$G_{Lac}1$(y) und die 4. Säule mit einem Gemisch aus peracetylierten ^{3}H-Phospholipiden(y) beladen und eluiert.

Die Fraktionen 1 - 4 wurden auf vier verschiedene Florisilsäulen mit einem Säulenvolumen von 8 ml gegeben und nach Saito-Hakomori (12) eluiert. Die Elutionsvolumina wurde so gewählt, daß mehr als 95 % der zugesetzten radioaktiven Substanzen im Eluat erschienen. Es wurden jeweils 20 ml Eluat aufgefangen, eingedampft und ein Fünftel davon gezählt. Bei den Säulen 2 und 3 wurden im Bereich von 140 bis 170 ml der 1,2-Dichloräthan-Aceton-Fraktion jeweils 10 ml eingedampft und nach Lösen in Chloroform : Methanol (1:1, v/v) ein Fünftel davon gezählt. Ein weiteres Fünftel dieser Lösung wurde dünnschichtchromatographisch und mit Orcin und Schwefelsäure auf Kohlenhydrate geprüft.

Die beiden Glykosphingolipid-Fraktionen (Monohexosylceramid und $G_{Gtet}1$ wurden mit Ninhydrin und Phosphosprühreagenz auf Protein und Phospholipidverunreinigung getestet.

Modifizierung und Optimierung dieser Methode:
Ein Gewebeextrakt aus Rattenmilz von ca. 250 mg, der mit Chloroform : Methanol : Wasser gewonnen wurde, wurde nach Peracetylierung an einer Florisilsäule von 4 g gereinigt. Die Cholesterinester wurden mit dem Achtfachen des Säulenvolumens (SV) an DCE : Hexan (1:1, v/v) und dem Zehnfachen der SV an DCE eluiert. Mit dem Fünfzehnfachen des SV an DCE : Aceton (1:1, v/v) wurden die peracetylierten

---

(x) Die organischen Lösungsmittel wurden von der Firma E. Merck, Darmstadt bezogen. Methanol wurde über Magnesium, Chloroform, 1,2-Dichloräthan und Aceton über P_2O_5 getrocknet und abdestilliert.

(y) Cholesterin bzw. Phospholipide wurden extrahiert, gereinigt, umkristallisiert und nach G. Schwarzmann (33) markiert. Tritium-markiertes Monohexosylceramid und ^{3}H-$G_{Gtet}1$ wurden von G. Schwarzmann zur Verfügung gestellt.

Glykosphingolipide und mit dem Fünfzehnfachen des SV an Methanol : DCE : Wasser (20:80:20, v/v) wurden die Phospholipide von der Florisilsäule eluiert.

Die in der DCE-Aceton-Fraktion enthaltenen peracetylierten Glykosphingolipide wurden mit einer katalytischen Menge von $NaOCH_3$ in Gegenwart von Methanol de-O-acetyliert.

Optimierung der Dialyseprozedur

In der Doppelmembrandialysekammer mit einem Kammervolumen von 3,5 ml wurde ^3H-G_{Gtet}] 6 Stunden lang kontinuierlich gegen Bidestilliertes Wasser bei 20 °C dialysiert.

Abtrennung des Restcholesterins von den Glykosphingolipiden durch Ätherextraktion

Die im Stickstoffstrom eingedampfte Probe wurde in einem mit Teflon abgedichteten Schraubkappengefäß (Sovirel Nr. 13) nach Zugabe von 5-6 ml absolutem und über Natrium getrocknetem und abdestilliertem Diäthyläther (Firma E. Merck), entweder 2 min. in flüssigem Stickstoff oder 5 min. im Tiefkühlschrank bei -30 °C gelagert, bei -20 °C und abzentrifugiert. Mit einer Pasteurpipette wurde die Ätherlösung abgehebert.

Radioaktive Markierung der Glykosphingolipide

Zu 1,5 mg Glykosphingolipiden wurden 250 ug des internen Standards (3,4-Isopropyliden-ß-D-galaktosylceramid(x)) gegeben und in einem Schraubkappenglas eingedampft. (Wurden die Gesamt-Glykosphingolipide vorher in neutrale und saure Komponenten getrennt (2.2.7.1.), so wurde zusätzlich der

(x) 3,4-Isopropylidin-ß-D-galaktopyranosylceramid wurde von G. Schwarzmann nach Standardmethoden synthetisiert (61).

Gangliosid-Sulfatid-Fraktion Galaktosylceramid aus Menschenhirn als interner Standard zugesetzt!)

Zum trockenen Rückstand wurden 2 mg $PdCl_2$ eingewogen und mit 0,5 ml Tetrahydrofuran suspendiert. Danach wurde eine Lösung, die aus 0,3 ml Diäthylglycoldimethyläther, 0,2 ml 0,1 N NaOH und 0,5 mg ^3H-KBH_4 (x) bestand, zu der Probe gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 20 °C belassen. Die Hydrierung geschah in einem mit Teflon abgedichteten Schraubkappenglas. Nach Ablauf der Reaktion wurden einige Tropfen Eisessig zugesetzt, um eventuell nicht umgesetztes ^3H-Kaliumborhydrid zu zerstören. Die Probe wurde zehnmal mit Stickstoff unter Zusatz von Chloroform : Methanol : Wasser (10:20:2, v/v) zur Trockene eingedampft, um labil gebundenes Tritium gegen Wasserstoff auszutauschen.

Nach der Dialyse, die wie oben beschrieben durchgeführt wurde, wurde die Probe eingedampft und in 1 ml Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v) aufgenommen und ein Aliquot wurde gezählt.

Autoradiographischer Nachweis von dünnschichtchromatographisch getrennter ^3H-Glykosphingolipide

Durch zweifach gegenläufiges ca. eine Sekunde langes Eintauchen einer 90 cm^2 großen Kieselgelplatte (Kieselgel 60 oder High Performance thin Layer Chromatografie Plate, E. Merck) wurde eine PPO-Beschichtung(y) von 270 mg pro 90 cm erreicht.

Als Röntgenfilm wurde der Kodack RP-X-Omat verwendet. Die Fluorographie wurde bei -78 °C und die Autoradiographie bei +20 °C durchgeführt.

(x) Amersham Buchler

(y) 2,5-Diphenyloxazol (PPO) wurde als p.a. Reagenz von der Firma E. Merck, Darmstadt bezogen.

Trennung der Glykosphingolipide in neutrale und saure Komponenten

0,5 mg ^{3}H-Monohexosylceramid und 0,08 mg ^{3}H-$G_{Lac}1$ wurden in 6 ml einer Lösung aus Methanol : Chloroform : Wasser (60:30:8, v/v) - im folgenden als Solvent A benannt - gelöst. Diese Lösung wurde langsam auf eine nach Ledeen et.al. (22) vorbehandelte DEAE-Sephadexsäule(x) (40 mg) in der Acetatform gegeben. Die Säule wurde mit 6 ml Solvent A eluiert. Die vereinigten Solvent A-Fraktionen wurden eingeengt und die Radioaktivität in einem Aliquot bestimmt. Anschließend wurde die Säule mit 4 ml einer Lösung aus Methanol : Chloroform : 0,8 wässrige Na-Acetat-Lösung (60:30:8, v/v) eluiert - im folgenden als Solvent B benannt. Nach Dialyse (2.2.3.) der sauren Glykosphingolipide (Solvent B-Fraktion) wurde ihre Radioaktivität in einem Aliquot bestimmt.

Dünnschichtchromatographische Trennung von Glykosphingolipiden

Zur dünnschichtchromatographischen Trennung der Glykosphingolipide wurden folgende Laufmittel verwendet.

Laufmittel Nr. I:
Chloroform : Methanol: Wasser (65 : 25 : 4, v/v) und 20 mg $CaCl_2$ pro 100 ml Solvent;

Laufmittel Nr. II:
Chloroform : Methanol : Wasser (10 : 1,5 : 0,1, v/v);

Laufmittel Nr. III:
Chloroform : Methanol : Wasser (60 : 35 : 7, v/v) und 20 mg $CaCl_2$ pro 100 ml Solvent;

Laufmittel Nr. IV:
Chloroform : Methanol : Wasser : conz. Ammoniak (60 : 35 : 6 : 2, v/v);

(x) DEAE-Sephadex wurde von der Firma Pharmacia, Upsala, Schweden bezogen.

Laufmittel Nr. V:
Chloroform : Methanol : Wasser : conz. Ammoniak
(71 : 20 : 1,8 : 0,3, v/v);

Laufmittel Nr. VI:
Butanol : Pyridin : Wasser (9 : 6 : 4, v/v) und
100 mg KCl pro 100 ml Solvent;

Laufmittel Nr. VII:
Propanol : Wasser (8 : 2, v/v) und 300 mg $CaCl_2$ pro 100 ml Solvent (Laufmittel VII);

Laufmittel Nr. VIII:
Chloroform : Methanol : Wasser (60 : 35 : 7, v/v).

Die Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme erfolgte bei 20 °C und in völliger Dunkelheit.

Selektiver Neuraminsäureabbau mit Neuraminidase

Die mittels der Autoradiographie (2.2.6.) lokalisierten Ganglioside wurden ausgekratzt und mit Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v) die Substanzen eluiert.

Die eingedampften Rückstände wurden mit 1 ml 0,1 M Natriumacetat-Puffer, der 0,3 ml $CaCl_2$ enthielt, aufgenommen und bei 37 °C mit 10 U Neuraminidase (Behringwerke AG Marbach) inkubiert. Nach 16 Stunden wurde nochmals 5 U Neuraminidase zugegeben. Die Reaktion wurde nach weiteren 3 Stunden durch Eindampfen der Lösung gestoppt und gegen destilliertes Wasser 40 Stunden bei 20 °C dialysiert.

Das eingedampfte Dialysat wurde auf einer HPTLC-Platte dünnschichtchromatographisch mit Chloroform : Methanol : conz. NH_3 : Wasser (60:35:6:2, v/v) als Laufmittel getrennt.

Hydrolyse und die Isolierung der Fettsäuren und Aminoalkohole

Die isolierten Glykosphingolipide wurden mit Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v) extrahiert. Die Überstände wurden eingedampft und der Rückstand mit 1 ml Hydrolyselösung (83 ml Methanol : 8,6 ml conz. HCl : 9,4 ml Wasser) 18 Stunden bei 70 °C in einem mit Teflon abgedichteten Schraubkappenglas hydrolysiert. Nach Abkühlen der Lösung auf 20 °C wurden die Fettsäuren und Fettsäuremethylester mit 1 ml n-Hexan (Fa. E. Merck, Darmstadt) extrahiert und abgehebert. Der Rest der Hydrolyselösung wurde mit 510 ul 2 N NaOH alkalisch gemacht und mit 1,5 ml Chloroform wurden die Sphingoidbasen extrahiert.

4.1.2. Prüfung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Analysenmethode im Mikromolbereich und Durchführung der Analysenmethode im Nanomolmaßstab

Drei Parallelproben von jeweils 160 mg Rattenmilz (gemahlen und gefriergetrocknet) wurden ^{3}H-Galaktosylceramid und $^{3}H\text{-}G_{Lac}^{1}$ zugesetzt.

Jede Probe wurde mit 6 ml Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v), mit 6 ml Chloroform : Methanol : Wasser (20:10:1, v/v), mit 6 ml Chloroform : Methanol : Wasser (10:20:1, v/v) je ca. 15 min. lang bei ca. 50 °C extrahiert.

Die Proben wurden in konisch verjüngten Sovirelröhrchen extrahiert (15 min.) bei 50 °C. Danach bei 4000 U/min abzentrifugiert und der Überstand in neue Kölbchen überführt und im N_2-Strom eingedampft. Der Rückstand wurde anschließend in 2,6 ml Chloroform : Methanol (1:1, v/v) gelöst. Der Chlorofrom-Methanol-Extraktionsüberstand wurde drei mal mit je 1,ml Toluol (abs.) bei 50 °C eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Toluol aufgenommen, zentri-

fugiert und der Überstand in neue Gläschen überführt. Der Rückstand wurde nochmals mit 2 ml Toluol nachgewaschen und die Toluolüberstände vereinigt. Die Prüfung des in Toluol unlöslichen Niederschlags auf Kohlenhydrate wurde nach Lösung des Niederschlags in Chloroform : Methanol (2:1, v/v) mit Anthron-Schwefelsäure durchgeführt. Die vereinigten Toluolextrakte wurden mit Toluol auf 1 ml aufgefüllt und die enthaltenen Glykosphingolipide durch Zusatz von 0,5 ml Pyridin und 0,3 ml Essigsäureanhydrid über Nacht acetyliert.

Die Vollständigkeit der Peracetylierung wurde dünnschichtchromatographisch überprüft.

Zur Entfernung von Pyridin, Essigsäureanhydrid und Wasser wurde die Probe mehrfach mit Toluol zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 1,2-Dichloräthan-Hexan gelöst und zur Reinigung auf eine Florisilsäule von 0,5 g gegeben.

Die 1. Elutionsfraktion bestand aus 10 ml DCE : Hexan (1:4, v/v).

Die 2. Elutionsfraktion bestehend aus 10 ml DCE : Aceton (1:1, v/v) wurde eingedampft und in 1 ml Chloroform : Methanol (1:1, v/v) aufgenommen, wovon 50 ul gezählt wurden.

Die 3. Elutionsfraktion bestand aus 20 ml DCE : Methanol : Wasser (20:80:20, v/v).

Die mit DCE : Aceton (1:1, v/v) eluierten peracetylierten Glykosphingolipide wurden in $CHCl_3$: CH_3OH (1:1, v/v) gelöst und durch Zusatz einer katalytischen Menge von $NaOCH_3$ de-O-acetyliert. Nach der De-O-Acetylierung wurden die Proben in einer eigens dazu konstruierten Dialysekammer gefüllt und bei 20 °C 6 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde mehrfach mit Toluol eingedampft, in 600 ul Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v) gelöst und ein Aliquot gezählt. Mit 6 ml absolutem Äther wurden die verbliebenen Cholesterinester bei -30 °C 4 min. lang extrahiert.

Die Ätherlösung wurde nach der Zentrifugation abgehebert, eingedampft und in 700 ul (Chloroform : Methanol, 2:1) aufgenommen und ein Aliquot gezählt. Der Rückstand wurde ebenfalls in 700 ul gelöst, ein Aliquot gezählt und wieder eingedampft.

Die Proben wurden in je 80 ml $CHCl_3$: CH_3OH : H_2O (30:60:8, v/v) Solvent A gelöst und jeweils auf eine Säule gegeben, die 600 mg DEAE-Sephadex in der Acetatform enthielt. Es wurden 2 mal mit je 8 ml Solvent A eluiert und dann nochmals mit 40 ml Solvent A nachgewaschen.

Mit 100 ml $CHCl_3$: CH_3OH : 0,8 M NaAc (30:60:8, v/v), im folgenden als Solvent B benannt, wurden die Ganglioside und Sulfatide eluiert. Die Solvent A/B-Fraktionen wurden jeweils eingedampft und in 600 ul ($CHCl_3$: CH_3OH : H_2O, 10:10:1) gelöst, wovon je ein Aliquot gezählt wurde. Solvent B wurde vorher dialysiert, um das die Zählausbeute verringernde Natriumacetat zu entfernen. Die Ergebnisse der Radioaktivitätsmessung sind in Tabelle IX zusammengestellt. Alle Zählröhrchen hatten den gleichen Quenteffekt. Alle Zählröhrchen, die die im Toluol gelösten Proben enthielten, wurden jeweils 40 ul Chloroform : Methanol: Wasser (10:10:1, v/v) als Quentschausgleich zugesetzt.

Durchführung der Analysenmethode:

Extraktion und Reinigung zellulärer Glykosphingolipide

1 mg gefriergetrocknetes Gewebs- oder Zellmaterial wurde mit je 2 ml Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v), (20:10:1, v/v) und (10:20:1, v/v) bei 50 °C 15 min. extrahiert.

Die Suspensionen wurden bei 4000 U/min abzentrifugiert und die vereinigten Überstände mehrmals mit je 1 ml Toluol im Stickstoff-Strom zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Toluol gelöst und die Glykosphingolipide

mit 0,25 ml Pyridin und 0,2 ml Essigsäureanhydrid über Nacht bei 20 °C peracetyliert.

Zur Entfernung von Pyridin, Essigsäureanhydrid und Wasser wurde die Probe 6 mal mit je 1 ml Toluol im Stickstoff-Strom eingedampft. Der trockene Rückstand wird in 1,2-Dichloräthan (DCE) aufgenommen und zur Reinigung auf eine Säule von 100 mg Florisil (Fa. Roth) mit einem Durchmesser von 1,7 mm aufgebracht.

Die Florisilsäule wurde nacheinander mit
2,1 ml DCE : Hexan (1:1, v/v);
1,6 ml DCE;
2,1 ml DCE : Aceton (1:1, v/v);
2,1 ml DCE : Methanol : Wasser (20:80:20, v/v)
eluiert.

Die mit DCE : Aceton eluierten peracetylierten Glykosphingolipide wurden eingedampft, in 0,7 ml Chloroform : Methanol (1:2, v/v) aufgenommen und durch Zusatz einer katalytischen Menge $NaOCH_3$ 5 min. bei 40 °C de-O-acetyliert. Nach nochmaliger Zugabe von $NaOCH_3$ wurde der Ansatz über Nacht bei 20 °C stehen gelassen.

Nach der De-O-Acetylierung wurden die Glykosphingolipide quantitativ in eine Dialysekammer überführt und über Nacht bei 20 °C kontinuierlich gegen bidestilliertes Wasser dialysiert.

Das Dialysat wurde quantitativ der Kammer entnommen und durch Zusatz von Toluol im Vakuum eingedampft. Das Restcholesterin der Probe wird in einem mit Stickstoff gefüllten Schraubkappenglas mit 2 ml abs. Diäthyläther bei -30 °C 4 min. extrahiert. Die Ätherphase wurde umgehend abgehebert und der Rückstand vorsichtig im Stickstoff-Strom getrocknet.

Tritium-Markierung der Glykosphingolipide

Den gereinigten Glykosphingolipiden wurde 20 ug 1,3-Isopropyliden-ß-D-galaktosylceramid oder 20 ug Galaktosylceramid als interner Standard zur Semiquantifizierung zugesetzt. Danach wurde die Probe wieder im Stickstoff-Strom trocken geblasen und über P_2O_5 nachgetrocknet.

Zu diesem Rückstand wurden 2 mg $PdCl_2$ eingewogen, mit 0,5 ml Tetrahydrofuran suspendiert und eine Lösung, die aus 0,3 ml Diglym, o,2 ml 0,1 N NaOH und 0,5 mg KB^3H_4 bestand, zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 20 ^oC belassen. Die Hydrierung geschah in einem mit Teflon abgedichteten Schraubkappenglas. Nach Ablauf der Reaktion wurden einige Tropfen Eisessig zugesetzt. Die Probe wurde zehnmal mit Stickstoff unter Zusatz von Chloroform : Methanol : Wasser (10:20:2, v/v) zur Trokkene eingedampft, um labil gebundenes Tritium gegen Wasserstoff auszutauschen und die Bildung von ^3H_2O bei der Dialyse zu vermeiden. Nach der Dialyse wurde die Probe eingedampft und in 1 ml Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v) aufgenommen.

Charakterisierung der Glykosphingolipide:

Trennung in neutrale Glykosphingolipide und in Ganglioside, Sulfatide

Die Probe wurde mit 4,5 ml Chloroform : Methanol : Wasser (30:60:8, v/v) (Solvent A) gelöst und auf 40 mg DEAE-Sephadex (Pharmacia) in Acetatform (nach Y. Ledeen) mit einer Geschwindigkeit von 0,1 ml/min gegeben.

Die DEAE-Sephadex-Säule wurde mit 0,5 ml Solvent A nachgewaschen, mit 2,5 ml Solvent A eluiert und die Solvent A-Fraktionen vereinigt.

Die Ganglioside und Sulfatide wurden mit 5 ml Chloroform : Methanol : 0,8 M Natriumacetat (30:60:8, v/v) (Solvent B) eluiert.

Die Solvent A-Fraktion und die Solvent B-Fraktion wurden jeweils mit Toluol in Vakuum eingeengt, dialysiert und die eingedampften Dialysate in Chloroform : Methanol : Wasser (10:10:1, v/v) aufgenommen.

Trennung und Lokalisierung radioaktiver Glykosphingolipide auf Dünnschichtchromatographieplatten

Aliquots der neutralen Glykosphingolipid-Fraktion (Fraktion A) wurden mit Laufmittel I auf Kieselgelfertigplatten 20 x 20 cm (Merck; Kieselgel 60) oder mit Laufmittel V auf HPTLC-Platten 10 x 5 cm (E. Merck) im Vergleich zu neutralen Glykosphingolipid-Standardsubstanzen getrennt.

Aliquots der Gangliosid, Sulfatid-Fraktion wurden mit Laufmittel VI, mit Laufmittel II auf Kieselgelfertigplatten (Merck; Kieselgel 60) oder mit Laufmittel III oder IV auf HPTLC-Platten (E. Merck) getrennt.

Die Kieselgelplatten wurden nach dem Lauf mit radioaktiver Tinte indiziert und zweimal gegenläufig für 1 sec. in eine 14 %ige PPO/Äther-Lösung getaucht. Ein Röntgenfilm (Kodak-X-Omat) wurde auf der Kieselgelplatte fixiert und bei -78 ^{o}C belichtet. Nach Entwicklung und Fixierung werden die dünnschichtchromatographisch getrennten Glykosphingolipide auf der Filmplatte sichtbar.

Selektiver Neuraminsäure-Abbau mit Neuraminidase (vibrio cholerae)

Die isolierten Glykosphingolipide wurden eingedampft, in 1 ml 0,1 M Natriumacetat-Puffer, der 0,3 mM $CaCl_2$ enthielt, aufgenommen und bei 37 ^{o}C mit 10 U Neuraminidase (Behringwerke) inkubiert.

Nach 16 Stunden werden nochmals 5 U Neuraminidase zugegeben, die Reaktion nach weiteren 3 Stunden durch Eindampfen gestoppt und anschließend gegen destilliertes Wasser (40 Stunden) bei 21 °C dialysiert.

Das eingedampfte Dialysat wurde über DEAE-Sephadex in neutrale und saure Glykosphingolipide getrennt, die anschließend dünnschichtchromatographisch differenziert und autoradiographisch identifiziert werden.

Partielle Säurehydrolyse des Kohlenhydratteils der Glykosphingolipide

Die isolierten Glykosphingolipide wurden mit 100 ul 1 M HCl-CH_3OH und 400 ul H_2O 15, 30, 60 und 120 min. lang bei 80 °C fraktioniert, abgebaut, dialysiert und anschließend dünnschichtchromatographisch getrennt und autoradiographisch identifiziert.

Bestimmung der ungesättigten Fettsäuren und des Sphingosins im Ceramidteil der Glykosphingolipide

Die isolierten Glykosphingolipide wurden mit 1 ml Hydrolyselösung (83 ml Methanol : 8,6 ml conz. HCl : 9,4 ml Wasser) 18 Stunden bei 70 °C in einem mit Teflon abgedichteten Schraubkappenglas hydrolisiert (4.1.1.).

Nach Abkühlen auf 20 °C wurden die Fettsäuren und Fettsäuremethylester mit 1 ml n-Hexan extrahiert und abgehebert.

Der Rest der Hydrolyselösung wurde mit 510 ul 2 N NaOH alkalisch gemacht und die Sphingoidbasen mit 1,5 ml $CHCl_3$ extrahiert. Die Chloroformphase wurde im Stickstoff-Strom eingeengt. Von der Fettsäure- bzw. Sphingoidbasen-Phase wurden jeweils Aliquots mit 10 ml Unisolve 100 (Fa. Roth) im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt (Fa. LKB).

Semiquantitative Bestimmung der Glykosphingolipide

Aliquots der dünnschichtchromatographisch getrennten Glykosphingolipide und des internen Standards wurden hydrolysiert, die Radioaktivität in den Sphingoidbasen der Proben-Glykosphingolipide und des internen Standards gemessen und eine semiquantitative Bestimmung der Glykosphingolipide durchgeführt.

4.2. Anwendungsbeispiele der Analysenmethode

4.2.1. Änderung der Glykosphingolipide des Rattendarms nach Änderung der Nährstoffversorgung der Ratten

Männliche Wistarratten mit einem Lebendgewicht von 201 bis 268 g wurden in 6 Fütterungsgruppen zusammengefaßt.

Die Gruppe, die mit Normalkost gefüttert wurde, enthielt 7 und die anderen Gruppen jeweils 3 etwa gleich schwere Tiere.

Die Gruppen wurden wie folgt gefüttert:

Gruppe 1:
Fütterung 14 Tage lang mit Normalkost.

Gruppe 2:
10 Tage lang Normalkost, dann 60 h Fütterung mit proteinreicher, kohlenhydratarmer Diät, dann für 60 h Futterentzug.

Gruppe 3:
10 Tage lang Normalkost, dann Futterentzug für 60 h, bei Wasseraufnahme ad libitum; dann wieder Normalkost für 60 h.

Gruppe 4:
10 Tage lang Normalkost, dann 60 h Fütterung mit der proteinreichen und kohlenhydratarmen Diät.

Gruppe 5:
10 Tage lang Normalkost, dann Futterentzug für 60 h, bei Wasseraufnahme ad libitum; dann 60 h Normalkost.

Gruppe 6:

10 Tage lang Normalkost, dann 60 h Fütterung mit der proteinreichen, kohlenhydratarmen Diät, dann 60 h Normalkost.

Die Normalkost(*) war wie folgt zusammengesetzt:

24,0 %	Casein
50,0 %	Stärke
11,0 %	Glukose
3,0 %	Sojaöl, raffiniert
5,0 %	Cellulosepulver
1,0 %	Vitaminmischung *
6,0 %	Mineralsalzgemisch **
100,0 %	

* Vitaminzusatz in 1000 g fertiger Diät

Vitamin A	14 000	I. E.
Vitamin D_3	600	I. E.
α-Tocopherolacetat	140	mg
Menadion	10	mg
Thiaminmononitrat	20	mg
Riboflavin	20	mg
Pyridoxinhydrochlorid	20	mg
Cyanocobalamin	30	mcg
Calcium-D-pantothenat	60	mg
Nicotinsäureamid	50	mg
Folsäure	10	mg
Biotin	150	mcg
meso-Inosit	80	mg
p-Aminobenzoesäure	80	mg
Cholinchlorid	1000	mg
L-Ascorbinsäure	15	mg
Rutin	50	mg
Orotsäure	60	mg
DL-Methionin	1000	mg
Stärke ad	10,0	g

** Mineralstoffzusatz in 1000 g fertiger Diät

$CaCO_3$	18,0000 g
$Ca_5(PO_4)_3(OH)$	9,7500 g
$CoCl_2$	0,0005 g
$CuSO_4$	0,0250 g
Fe-(II)-fumarat	0,5000 g
K_2HPO_4	11,0000 g
KJ	0,0005 g
$MgSO_4$	5,5000 g
$MnSO_4$	0,4500 g
NaCl	7,6000 g
NaF	0,0035 g
Na_2HPO_4	7,1000 g
Na_2MoO_4	0,0005 g
$NH_4Al(SO_4)_2$	0,0190 g
$ZnCO_3$	0,0450 g
	60,0000 g

Bemerkungen: Diese Diät ist in ihrer Zusammensetzung als vollwertig anzusehen, d. h., sie deckt den nutritiven Bedarf von Ratte und Maus. Als Kontrolldiät ist sie zur Verfütterung an die Kontrollgruppe gedacht und erlaubt den exakten Vergleich der Versuchsergebnisse zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.

Die proteinreiche, fettreiche und kohlenhydratarme Diät(*) war wie folgt zusammengesetzt

57,0 %	Casein
5,0 %	Stärke
12,0 %	Sojaöl
16,0 %	Cellulosepulver
1,0 %	Vitaminmischung *
9,0 %	Mineralsalzgemisch **
100,0 %	

* Vitamin A 14 000 I. E.
Vitamin D_3 600 I. E.
α-Tocopherolacetat 140 mg
Menadion 10 mg
Thiaminmononitrat 20 mg
Riboflavin 20 mg
Pyridoxinhydrochlorid 20 mg
Cyanocobalamin 30 mcg
Calcium-D-pantothenat 60 mg
Nicotinsäureamid 50 mg
Folsäure 10 mg
Biotin 150 mcg
meso-Inosit 80 mg
p-Aminobenzoesäure 80 mg
Cholinchlorid 1000 mg
L-Ascorbinsäure 15 mg
Rutin 50 mg
Orotsäure 60 mg
DL-Methionin 2000 mg
Stärke ad 10,0 g

** Mineralstoffzusatz in 1000 g fertiger Diät

$CaCO_3$	18,0000 g
$Ca_5(PO_4)_3(OH)$	9,7500 g
$CoCl_2$	0,0005 g
$CuSO_4$	0,0250 g
Fe-(II)-fumarat	0,5000 g
K_2HPO_4	11,0000 g
KJ	0,0005 g
$MgSO_4$	5,5000 g
$MnSO_4$	0,4500 g
NaCl	7,6000 g
NaF	0,0035 g
$NaHCO_3$	20,0000 g
Na_2HPO_4	7,1000 g
Na_2MoO_4	0,0005 g
$NH_4Al(SO_4)_2$	0,0190 g
$ZnCO_3$	0,0450 g
	90,0000 g

(*) Die Futtermischungen wurden von der Fa. Ssniff, Soest-Westfalen bezogen.

4.2.2. In vitro-Transport von D-Glucose und L-Leucin von der Mukosa- zur Serosaseite gegen einen Konzentrationsgradienten

Die Resorptionsmessung wurde für D-Glucose und L-Leucin nach der Methode von Äppli-Schmidt, Meinen u. Rehner und mit der von ihnen entwickelten Apparatur durchgeführt.

Zur Resorptionsmessung von D-Glucose und L-Leucin konnten aus technischen Gründen nur die Tiere der Gruppen 1, 3, 4 und 5 verwendet werden. Den Tieren der Gruppen 1, 3 und 4 wurden in der Nacht vor dem Schlachten das Futter entzogen, um die Kotmenge gering zu halten.

Die Tiere wurden mit einem Schlag auf den Hinterkopf betäubt und dekapitiert. Der Bauchraum wurde geöffnet und ein ca. 20 cm langes Jejunumstück herausgenommen und sofort mit einer Sauerstoffgesättigten Krebs-Ringer-Lösung(*) durchgespült.

Das Jejunumsegment wurde dreigeteilt und der mittlere Teil zur Resorptionsmessung verwendet. Die beiden anderen Teile wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -30 °C bis zur Glykosphingolipid-Analyse gelagert.

Der mittlere Jejunumteil wurde mit einem dünnen Glasstab gewendet, so daß die Serosaseite nach innen und die Mukosaseite nach außen zeigte. Die beiden Enden des ca. 5 cm langen Darmstückes wurden an zwei dünnen Glasröhrchen befestigt und locker in eine Sauerstoff-gesättigte Krebs-Ringer-Lösung (70 ml) (*) gehängt.

Dieser Lösung wurden die zu untersuchenden Substanzen D-Glucose bzw. L-Leucin zugesetzt (Konzentration 5 mM). Sie enthielt am Beginn der Resorptions-Messung ebenfalls ^{3}H-D-Glucose mit einer Aktivität von 40 n Ci/ml bzw. ^{14}C-L-Leucin mit 8,3 n Ci/ml. Diese Lösung wird im folgenden als Inkubationlösung bezeichnet.

(*) Die Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung bestand aus:
100 Teilen 0,154 M NaCl; 4 Teilen 0,154 M KCl;
3 Teilen 0,110 M $CaCl_2$; 1 Teil 0,154 M KH_2PO_4;
1 Teil 0,154 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 21 Teile 0,154 M $NaHCO_3$

Das Darminnere (jetzt Serosaseite!) wurde kontinuierlich mit der Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung, die 5 mM D-Glucose bzw. 5 mM L-Leucin enthielt, perfundiert (3,1 ml/10 min). Sie wird als Perfusionslösung bezeichnet.

Der Unterschied zwischen der Inkubations- und der Perfusionslösung bestand darin, daß der Inkubationslösung zusätzlich radioaktive Glucose und Leucin zugesetzt wurde.

Nach dem Transport des Zuckers bzw. der Aminosäure durch die Darmwand, gegen einen Konzentrationsgradienten, wurden die resorbierten Substanzen von der Perfusionslösung weiterbefördert und im Abstand von 10 min. fraktioniert aufgefangen. Je 2 ml dieser Perfusionslösung wurden mit 8 ml Braysolution(*) im Beckmann-Flüssigkeitsszintillation zähler gezählt. Damit konnte die transportierte Menge D-Glucose und L-Leucin pro 10 min. und ein Darmabschnitt berechnet werden.

Um den Einfluß von Gangliosiden auf den Leucin- und Glucos transport untersuchen zu können, wurde die Resorptionsmessung in der Inkubationslösung durchgeführt, die 17 nMol Ganglioside $G_{Gtet}1$, $G_{Gtet}2a$ und $G_{Gtet}2b$ pro ml enthielt.

In einem weiteren Versuch wurde das Darmsegment 20 min. lang mit der Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung vorinkubiert, die auch 17 Mol $G_{Gtet}1$, $G_{Gtet}2a$, $G_{Gtet}2b$ pro ml enthielt und anschließend der Resorptionsmessung unterworfen.

(*) Als Szintillator wurde folgende Lösung verwendet:

1	l	Dioxan,
100,0	g	Naphtalin,
14,0	g	2,5-Diphenyloxazol (PPO)
0,6	g	2,2-p-Phenylenbig-C4-methyl-5-phenyloxazol (Dimethyl-POPOP)

4.2.3. Gaschromatographische Analyse von Fettsäuren und Sphingosin

Die Fettsäuremethylester wurden in Chloroform gelöst, wovon ein Aliquot in einen Hewlett-Packard GLC Nr. 3830A injiziert wurde, der eine OV 1-Glas-Säule enthielt. Als Trägergas wurde Stickstoff mit einer Geschwindigkeit von 32 ml/min verwendet.

Es wurde ein Temperaturprogramm von 175 °C - 250 °C mit einer Heizrate von 7 °C/min verwendet.

Die Temperatur des FID betrug 230 °C. Die Injektionskammer wurde auf 320 °C geheizt.

Die gaschromatographische Analyse des Sphingosins/Sphinganins und Phytosphingosins wurde mit der gleichen Anordnung durchgeführt. Nur das Temperaturprogramm wurde verändert (233 °C - 280 °C; bei 10 °C/min.).

Die Fettsäure- und Sphingosinpeaks wurden mit Hilfe von Standardsubstanzen identifiziert. (Fettsäuremischung: Serva Heidelberg; C 18 Sphingosin wurde von Dr. Schwarzmann und C 18 Phytosphingosin von Dr. Barenholz, Jerusalem, erhalten.)

4.2.4. Gaschromatographische Zuckeranalyse

Die vier Gangliosidbanden wurden wie oben beschrieben isoliert und mit 2 ml 1,8 N methanolische HCl 15 Stunden bei 70 °C methanolisiert.

Die Lösung wurde eingedampft, der Rückstand mit 50 ul Trimethylsilylfluorid silyliert und 1 ul gaschromatographisch analysiert.

Der Hewlett-Packard-GLC Nr. 3830A enthielt eine 3,14 m lange Glassäule mit einem Durchmesser von 2 mm und einer

Füllung von 2 % Dexil an Chromosorb (Mesch 80-100). Als Trägergas wurde Stickstoff mit einer Geschwindigkeit von 32 ml/min verwendet. Die Temperatur des FID betrug 250 °C. Die Injektionskammer wurde auf 220 °C geheizt. Es wurde ein Temperaturprogramm von 150 - 250 °C/min verwendet.

4.3. Änderung der Glykosphingolipide nach Inkubation des Kaninchendarms mit Enterotoxinen

Ausgewachsenen Kaninchen wurde unter Narkose der Bauchraum geöffnet, ca. 50 cm des Dünndarms abgebunden und 1 mg Cholera- bzw. E. Coli-Toxin injiziert.

Das Kontrolltier wurde identisch behandelt und eine Kochsalzlösung injiziert. Anschließend wurden die Wunden vernäht.

Nach 24 h wurden die Kaninchen getötet und das abgebundene Darmstück aus den Tieren herausgenommen. Diese Arbeiten wurden von Dr. Stärk und Dr. Ronneberger (Behringwerke AG Marbach) ausgeführt.

Aus den Darmsäcken wurde das Wasser entfernt, wobei die abgestoßenen Darmepithelien des mit Choleratoxin behandelten Darms aufgehoben wurden.

Die Därme wurden gefriergetrocknet und 3 mal mit je 100 ml Chloroform : Methanol : Wasser-Gemischen (4.1.1.) extrahiert. Die Überstände wurden eingedampft und jeweils 1/10 der Darmextrakte wurden wie unter 4.1.1. beschrieben aufgearbeitet und dünnschichtchromatographisch analysiert.

4.4. Änderung der Hirnglykosphingolipide des Göttinger Minischweines nach Chlorochinbehandlung

Einem Göttinger Minischwein mit einem Körpergewicht von 12 kg wurde von Dr. Klinghardt (Max Planck Institut für Hirnforschung) 73 Tage lang steigende Mengen von 2 - 3,5 g Chlorochin pro kg Futter oral verabreicht. Danach wurde das Schwein getötet und einige Milligramm Material der Spinalganglien entnommen und die Glykosphingolipide wie unter 4.1.2. beschrieben isoliert und nach Tritium-Markierung mittels der Dünnschichtchromatographie qualitativ analysiert.

4.5. Untersuchung der Glykosphingolipid-Zusammensetzung peripherer Humanlymphozyten-Populationen

Humanlymphozyten wurden von Dr. Seiler (Behringwerke AG Marbach) isoliert und mittels der trägerfreien Elektrophorese in drei unterschiedlich wandernde Fraktionen getrennt.

Die dialysierten und gefriergetrockneten Lymphozyten der einzelnen Fraktionen (1,4 - 1,7 mg) wurden im Vergleich mit 1,5 mg Humanlymphozyten, die in Zellkultur gehalten wurden wie unter 4.1.2. beschrieben extrahiert und die ^{3}H-Glykosphingolipide qualitativ mittels der Dünnschichtchromatographie analysiert.

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, Veränderungen der Funktion von Geweben und Zellen mit Änderungen ihrer Glykosphingolipide zu korrelieren, um dadurch möglicherweise einen Beitrag zur Klärung der Bedeutung von Glykosphingolipiden in der Zellmembran leisten zu können.

Aus diesem Grunde wurde eine Methode zur Charakterisierung und semiquantitativen Bestimmung von Glykosphingolipiden im Nanomol-Bereich entwickelt, die auf der Tritiierung von Doppelbindungen im Ceramidteil beruht.

Die Untersuchungen wurden vor allem am Darm durchgeführt.

Zum einen konnte im Hunger und nach einer kohlenhydratarmen und proteinreichen Diät eine Steigerung der aktiven Transporte von D-Glucose und L-Leucin mit einer Abnahme von Glykosphingolipiden und Phospholipiden bezogen auf das Trockengewicht des Darms bei erhöhtem Einbau von Hydroxy-Fettsäuren in die Glykosphingolipide des proximalen Jejunums von Wistarratten korreliert werden. Bei der Umstellung der Hunger- und Diätratten auf Normalkost nahm der Glykosphingolipid- und Phospholipidgehalt wieder Normalwerte an, wobei ein verstärkter Einbau von gesättigten Fettsäuren und eine Abnahme von Hydroxy-Fettsäuren in die Glykosphingolipide zu beobachten war.

Eine mögliche Erklärung der Ergebnisse besteht darin, daß in folge von fast völligem Fehlens verwertbarer Kohlenhydrate in der Nahrung, eine verstärkte -Oxidation der Fettsäuren in den Mukosazellen zu einer Abnahme der untersuchten Membranlipide führt, wobei Hydroxy-Fettsäuren langsamer abgebaut werden als gesättigte und ungesättigte Fettsäuren.

Ob die Steigerung der aktiven Transporte im Hunger und nach Diäternährung ebenfalls auf eine Aktivierung der Transportsysteme infolge von Membranveränderungen zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden. Interessant ist

jedoch, daß D-Glucose und L-Leucin in Gegenwart von exogenen Gangliosiden verstärkt resorbiert wurden.

Zum anderen wurde der Einfluß von Enterotoxinen wie E. coli- und Cholera-Toxin auf die Glykosphingolipide des Kaninchendarms untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß ein neutrales Glykosphingolipid nach der Inkubation beider Toxine angereichert wird, wodurch aber sicherlich nicht die drastischen Funktionsänderungen des Choleradarms zu erklären sind.

Darüberhinaus konnte mit der neuen Analysenmethode gezeigt werden, daß eine Langzeitbehandlung von Göttinger Minischweinen mit Chlorochin zu einer Speicherung bestimmter Glykosphingolipide in den Spinalganglien führt.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß Populationen peripherer Humanlymphozyten von einem Spender starke Unterschiede der neutralen Glykosphingolipide aufweisen.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Analysenmethode ist eine Möglichkeit gegeben, nicht nur im Mikromol-Bereich, sondern auch im Nanomol-Bereich an kleinsten Mengen homogenen Zellmaterials detaillierte Studien über die qualitative und nahezu quantitative Zusammensetzung von Glykosphingolipiden durchzuführen, um nähere Einblicke über die biologische Bedeutung dieser Membranlipide zu erhalten.

Literaturverzeichnis

1. Wiegandt, H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354 (1973) 1049
2. Svennerholm, L.: J. Neuchem., 10 (1963) 613
3. Thudicum: Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere G. Pietscher, Tübingen, 1904
4. Klenk, E.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 262 (1939) 128
5. Sandhoff, K.: Angew. Chem., 89 (1977) 283-295
6. Wiegandt, H.: Adv. Lipid. Res., 9 (1971) 249-289
7. Hakomori, S.: Adv. Cancer Res., 18 (1971) 265
8. Hakomori, S.: Biochem. Biophys. Acta, 417 (1975) 55-89
9. Brady, R.O. et.al.: Glycolipids in Malignancy. Alterations in Membrane Glycolipid in Tumorigenic Virus-Transformed Cell Lines; In Membrane Mediated Information, Kent, P.W. (Ed.), Medical and Technical Publishing, Ltd., Lancaster England, p. 48-64
10. Roseman, S.: J. Cell. Biol., 51 (1971) 536-547
11. Roth, S. and White, D.: Proz. Natl. Acad. Sci. USA, 69 (1972) 485-489
12. v. Heyningen et.al.: J. Inf. Dis., 124 (1971) 415-418
13. Watkins, W.M.: Glycoproteins: their composition, structure, and function; Elsvier, Amsterdam; Part B (1972) p. 830-89
14. Koscielak, A.: Membrane Mediated Information, Kent P.W. (Ed.), Medical and Technical Publishing, Ltd., Lancester England, Vol. 1 (1973) p. 95-104

15. Morgan, W.T.J.: Methods in Immunology and Immunchemistry, Ed. Williams, Academic Press, New York, Vol. 1 (1967)

16. Brady, R.O.: Biochem. Biophys. Res. Co., 59 (1974) 292

17. Hakomori, S. and Ishizuka, I.: Handbook of Biochemistry and Molekular Biology; Lipids, Carbohydrates, Steroids; CRC-Press, Cleveland (1976) p. 416-425

18. Folch, J. et.al.: J. Biol. Chem., 226 (1957) 497-509

19. Suzuki, K.: J. Neuchem., 12 (1965) 628-638

20. Saito, T. and Hakomori, S.: J. Lipid Res., 12 (1971) 257-259

21. Winterbourn, C.: J. Neuchem., 13 (1971) 1153

22. Ledeen, R.W. et.al.: J. Neuchem., 21 (1973) 829-839

23. Kuhn und Wiegandt, H.: Chem. Berichte, 96 (1963) 866 ff

24. Kundu, S.K. et.al.: J. Lipid.Res. 19 (1978) 390-395

25. Momoi, T. et.al.: Biochem. Biophys. Acta, 441 (1976) 488-497

26. van den Eijnden, D.H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352 (1974) 1601-1602

27. Harzer, U.H. et.al.: Zeit. Anal. Chem., 243 (1968) 527-536

28. Jacin, H. et.al.: J. Chromatographie, 18 (1965) 170 ff

29. Hearcock, M.E. et.al.: J. Chromatographie, 17 (1965) 338 ff

30. Naoi, N. et.al.: Analytical Biochemistry, 58 (1974) 571-577

31. Sandhoff, K.: Inaug. Diss., München (1965)

32. Sayema, Y. et.al.: J. Biochem. (Tokyo), 64 (1968) 487-493

33. Schwarzmann, G.: Biochem. Biophys. Acta, 529 (1978) 106-114

34. Kenffer: personal communication 1977

35. Randerath, K.: Analytical Biochemistry, 34 (1970) 188-205

36. Sambazivarao, K. et.al.: J. Lipid Res., 5 (1964) 103-108

37. Forstner, G.G. and Wherrett, J.R.: Biochem. Biophys. Acta, 306 (1973) 446-459

38. Lipkin, M.: Physiol. Rev., 53 (1973) 891-915

39. Altmann, G.G.: Intestinal Adaptation, Schattauer Verlag Stuttgart, 1974, S. 8, (Ed.) Dowling, R.H., Riecken, E.O.

40. Weiser, M.W.: J. Biol. Chem., 248 (1973) 2536-2541

41. Kershaw, T.G. et.al.: J. Physiol., 152 (1960) 182

42. Lis, M. et.al.: Br. J. Nutr., 27 (1972) 159-167

43. Steiner, M. et.al.: Amer. J. Physiol., 217 (1969) 747-752

44. Scharrer, E. et.al.: Z. Tierphysiol., Tierernährg., 2 (1971) 327-337

45. Neale, R.I.: Intestinal Adaptation a.a.O. S. 107-114

46. Scharrer, E. und Kelch, G.: Z. Tierphysiol., Tierernäh 33 (1974) 34-42

47. Hindmarsh, I.T. et.al.: J. Physiol., 188 (1967) 207-218

48. Haberich, I.F. et.al.: Ernährungsumschau, 11 (1977) 374

49. Aeppli-Schmidt, R.: Inaug. Diss., Gießen (1974)

50. Meinen, M.: Inaug. Diss., Gießen (1976)

51. Klinghardt, G.W.: Acta neuropath. (Berlin), 28 (1974) 117-141

52. Sandhoff, K., zitiert nach Klinghardt, G.W.: personal communication 1976

53. Svennerholm, L.: paper in preparation

54. Reiser, S. et.al.: Amer. J. Physiol., 216 (1969) 915-924

55. Wright, Ch. u. Barber, H.E.: Biochem. J., 115 (1969) 1075-1076

56. Grolner, I.M. und van Golde, L.M.G.: Biochem. Biophys. Acta, 487 (1977) 105-114

57. Warren, G.B. et.al.: Proz. Natl. Acad. Sci. USA, No. 3, 71 (1974) 622 ff

58. Davis, K.: Biochem. Biophys. Acta, 373 (1974) 224 ff

59. Baldassare, I.: Biochemistry, Vol. 15, 3 (1976) 2986

60. Sharom, F.J. and Grant, C.: Biochem. Biophys. Acta, (1978) 278-293

61. Taketomi, T.: Jap. J. exptl. Med., 44 (1974) 145-150

Frau Prof. Dr. G. Rehner und Frau Dr. M. Meinen vom Institut für Ernährungswissenschaften I der Justus Liebig-Universität in Gießen möchte ich für die Überlassung der Resorptions-Meß-Apparatur und für die freundliche Einweisung in die Resorptions-Meß-Technik danken.

Herrn Prof. Dr. Sturm und Frau U. Schäfer von der Universitäts-Frauenklinik Marburg gilt mein Dank für die mir gegebene Möglichkeit zur Durchführung der gaschromatographischen Analysen.

Darüberhinaus möchte ich den Herren Dr. Stärk und Dr. Ronneberger für die Toxininkubation der Kaninchendärme, Herrn Dr. Seiler für die Trennung peripherer Humanlymphozyten, Herrn Prof. Dr. Klinghardt für die Bereitstellung von Hirnmaterial von Chlorochin behandelten Minischweinen danken.

Die vorliegende Arbeit wurde finanziell durch den Sonderforschungsbereich 103, Teilprojekt C4/5.3 unterstützt.

Lebenslauf

3. Dezember 1946	geboren in Steina-Schwalmstadt
2. November 1966	Abitur an der Herderschule in Kassel
1. Januar 1967 – 1. Januar 1969	Bundeswehrsoldat
1. April 1969 – 28. Mai 1974	Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften an der Justus Liebig-Universität Gießen
seit 1. Oktober 1974	Aufbaustudium der Humanbiologie am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
seit 1. Mai 1975	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Physiologische Chemie I der Philipps-Universität Marburg